

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Estudio de la Expresión de las  
Moléculas de Adhesión del  
Complejo Cadherina-Catenina en  
el Nefroblastoma**

**TESIS DOCTORAL**

**Marco Antonio Ponce Camacho**

**Madrid, 2009**



**DAVID ALONSO HARDISSON HERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ DE MADRID,**

**JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ PERALTO, PROFESOR TITULAR DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DEL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE DE MADRID y**

**JESÚS ÁNCER RODRÍGUEZ, DOCTOR EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, MONTERREY, MÉXICO**

**CERTIFICAN QUE: D. MARCO ANTONIO PONCE CAMACHO, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación "Estudio de la Expresión de las Moléculas de Adhesión del Complejo Cadherina-Catenina en el Nefroblastoma", estudio que consideramos completamente satisfactorio para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid**

Lo que firmamos en Madrid a 9 de octubre de 2009

Fdo. David Hardisson  
Director

Fdo. José Luis Rodríguez Peralto  
Director

Fdo. Jesús Áncer.  
Director

## ***AGRADECIMIENTOS:***

al Prof. Dr. **David Hardisson**, por su constante apoyo, asesoría y magnífica dirección durante la realización de esta Tesis Doctoral, y de modo especial por su sincera amistad.

al Prof. Dr. **José Luis Rodríguez Peralto**, por su apoyo, por su generosa cesión de los casos de tumores renales estudiados, y por los acertados comentarios científicos.

al Prof. Dr. **Javier Regadera**, por su permanente y eficaz dirección del Convenio entre la UANL y la UAM y sobre todo por sus valiosos consejos académicos y por su constante y sincera amistad.

al Prof. Dr. **Manuel Nistal**, por su magisterio y dirección en la patología testicular, y por su generosidad científica y humana con el Departamento de Patología de la UANL.

al Dr. **Juan José de la Cruz**, por su excelente aportación científica en el análisis estadístico de los casos.

al Prof. Dr. **Jesús Áncer Rodríguez**, quién desde el principio y gracias a su constante perseverancia ha permitido obtener excelentes resultados académicos en todas las actividades del Convenio de la UANL con la UAM; pero además mi más sincera gratitud, porque siempre me guió con inteligencia y generosidad para que desarrollara mi actividad como patólogo general y pediátrico.

a mis compañeros y amigos **Profesores del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario y de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

A la Técnico Superior de Anatomía Patológica Dña. **Raquel Ramos**, por la calidad de sus técnicas inmunohistoquímicas

a las **Autoridades Académicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León**, que facilitaron mi realización de este estudio en la UAM.

y, de modo muy especial,  
a mi Alma Mater:  
**la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

***DEDICATORIA:***

a mi mujer **Aurea**,  
por su amor e incondicional apoyo

a mis hijos **Sara Abril y Alec**,  
por ser la alegría de mi vida y la luz que alumbra mi camino

a mi Madre **María Angélica**,  
de quien siempre he recibido ejemplo constante de honradez y perseverancia.

y a mis hermanos **Víctor, Miguel, Rocío y Mario**,  
de quienes he recibido siempre un apoyo incondicional



<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
NEFROGÉNESIS Y ONCOGÉNEIS	2
<i>Nefrogénesis</i>	3
<i>Polaridad Celular</i>	5
<i>Moléculas de Adhesión</i>	5
<i>Apoptosis</i>	7
GENES QUE CONTROLAN LA ORGANOGÉNESIS	7
<i>Factores de Transcripción</i>	7
• Factor Neurotrópico Derivado de la Línea Celular Glial ( <i>GDNF</i> )	7
• <i>PAX2</i>	8
<i>Genes Wnt</i>	8
<i>Factores de Crecimiento (Citoquinas)</i>	9
<i>Beta-Catenina</i>	10
<i>Policistina</i>	11
<i>Inductor del Metanefros</i>	12
INTEGRACIÓN DE LOS EVENTOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA NEFROGÉNESIS	12
TUMOR DE WILMS	15
<i>Biología Molecular del tumor de Wilms</i>	15
<i>Genes Asociados al Tumor de Wilms</i>	17
• <i>WT1</i>	17
* <i>Efectos Biológicos de WT1</i>	19
* <i>Mutaciones de WT1</i>	19
* <i>Otras Localizaciones de WT (Loci)</i>	19
<i>Otros Genes Asociados al Tumor de Wilms</i>	20
• <i>WTX y Glipican3</i>	20
• <i>p53</i>	20
• <i>Beta-Catenina</i>	21

BETA-CATENINA Y VÍA WNT	21
VÍA WNT	22
ESTRUCTURA GENÉTICA, EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y MUTACIONES DE BETA-CATENINA	25
<i>Beta-Catenina Como Parte del Complejo de Adhesión Cadherina/Catenina</i>	26
<i>Fosforregulación del Complejo de Degradación Beta-Catenina</i>	27
<i>Mutaciones en Beta-Catenina y Cáncer</i>	28
WNT Y TUMOR DE WILMS	29
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	32
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	34
MATERIAL	35
MÉTODOS	35
<i>Métodos de Estudio Histológico General</i>	35
• Fijación de las Piezas Quirúrgicas	35
• Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas	36
<i>Método Inmunohistoquímico de la Expresión Proteica.</i>	36
• Método Inmunohistoquímico de Envision	37
<i>Métodos de Interpretación de la Inmunoexpresión e Inmunolocalización</i>	38
• Valoración Cualitativa de $\alpha$ -Catenina, $\beta$ -Catenina, p120, $\gamma$ -Catenina, Cadherina-E y Cadherina-P	38
• Valoración Semicuantitativa de Ki67	39
<i>Métodos Estadísticos</i>	39
• Manejo de Datos	39
• Estadística Descriptiva	40
• Estadística Univariante	40
<i>Técnicas Fotográficas</i>	40
<b>RESULTADOS</b>	42
<i>Evaluación Semicuantitativa de la Intensidad de Inmunomarcaje de las Moléculas del Complejo Cadherina-Catenina en los Diferentes Patrones Histológicos de Nefroblastoma</i>	43
• Evaluación Morfológica de la Expresión de Cadherina-E en el Nefroblastoma	43

• Evaluación Morfológica de la Expresión de Cadherina-P en el Nefroblastoma	45
• Evaluación Morfológica de la Expresión de Alfa-Catenina en el Nefroblastoma	47
• Evaluación Morfológica de la Expresión de Beta-Catenina en el Nefroblastoma	48
• Evaluación Morfológica de la Expresión de Gamma-Catenina en el Nefroblastoma	51
• Evaluación Morfológica de la Expresión de p120 en el Nefroblastoma	52
• Evaluación Morfológica de la Expresión de Ki 67 en el Nefroblastoma	54
<i>Relación Entre el Perfil de Inmunoexpresión de <math>\beta</math>-Catenina y las Demás Moléculas Estudiadas del Complejo Cadherina-Catenina</i>	56
<i>Relación Entre la Inmunoexpresión Membranosa de Cadherina-E y las Cateninas Alfa, Beta, Gamma y p120</i>	64
<i>Relación de la Expresión de las Moléculas del Complejo Cadherina-Catenina Entre los Tres Compartimentos Celulares</i>	66
<i>Relación Entre la Expresión de Ki67 en los Distintos Patrones Histológicos del Nefroblastoma</i>	75
ICONOGRAFÍA	77
<b>DISCUSIÓN</b>	96
<b>CONCLUSIONES</b>	114
<b>RESUMEN</b>	116
<b>SUMMARY</b>	120
<b>REFERENCIAS</b>	124

# **INTRODUCCIÓN**

Las neoplasias de la edad pediátrica son únicas en su género ya que desde el punto de vista biológico e histológico existen marcadas diferencias entre éstas y las originadas en la etapa adulta. Entre dichas diferencias se encuentran la incidencia y el tipo de tumor, la prevalencia de aberraciones genéticas o familiares subyacentes, la tendencia a la regresión o cito diferenciación y, por último, la estrecha relación que existe entre las neoplasias de la edad pediátrica y la embriogénesis fallida o anormal (teratogénesis) y la oncogénesis (inducción tumoral). El conocimiento de estas características es de suma importancia pues ha contribuido al mejor conocimiento de la oncogénesis de los tumores pediátricos y, a la vez, a mejorar los métodos diagnósticos, y a desarrollar los métodos pronósticos lo que, finalmente, contribuye a la mejora de los esquemas terapéuticos usados en la actualidad con la consiguiente mejora en las tasas de supervivencia. A este respecto, el tumor de Wilms es un excelente ejemplo. El tumor de Wilms o nefroblastoma es una neoplasia renal infantil cuya arquitectura histológica recapitula la nefrogénesis en el humano.<sup>73</sup> En México, el tumor de Wilms es el tumor sólido más frecuente de este grupo etáreo, y corresponde al 8% de las neoplasias malignas de la edad pediátrica. Aunque mucho se sabe acerca de la patología molecular del tumor de Wilms, en los últimos años se ha abierto una nueva avenida en el estudio y conocimiento de esta particular neoplasia. En la actualidad, se han involucrado al menos siete loci genéticos en el desarrollo del tumor de Wilms (*WT1*, *WT2*, 16q, *FWT1*, *FWT2*, *WTX*, *CTNNB1*).<sup>193,201,204</sup> Cada uno de ellos posee una función específica en la nefrogénesis y en el desarrollo del tumor de Wilms. Más recientemente, se ha implicado de forma directa a la vía Wnt tanto en la embriogénesis, como en el desarrollo de neoplasias en el humano. El gen *WT1* es un gen de bases que actúa como factor de transcripción, está localizado en 11p13 y se asocia con el desarrollo del tumor de Wilms en pacientes con síndrome WAGR y síndrome de Denys-Drash.<sup>152</sup> El conocimiento y el entendimiento de los genes asociados con el desarrollo del tumor de Wilms ha ayudado a responder muchas preguntas acerca de la genética molecular y de la biología celular de la nefrogénesis.<sup>132</sup>

## NEFROGÉNESIS Y ONCOGÉNESIS

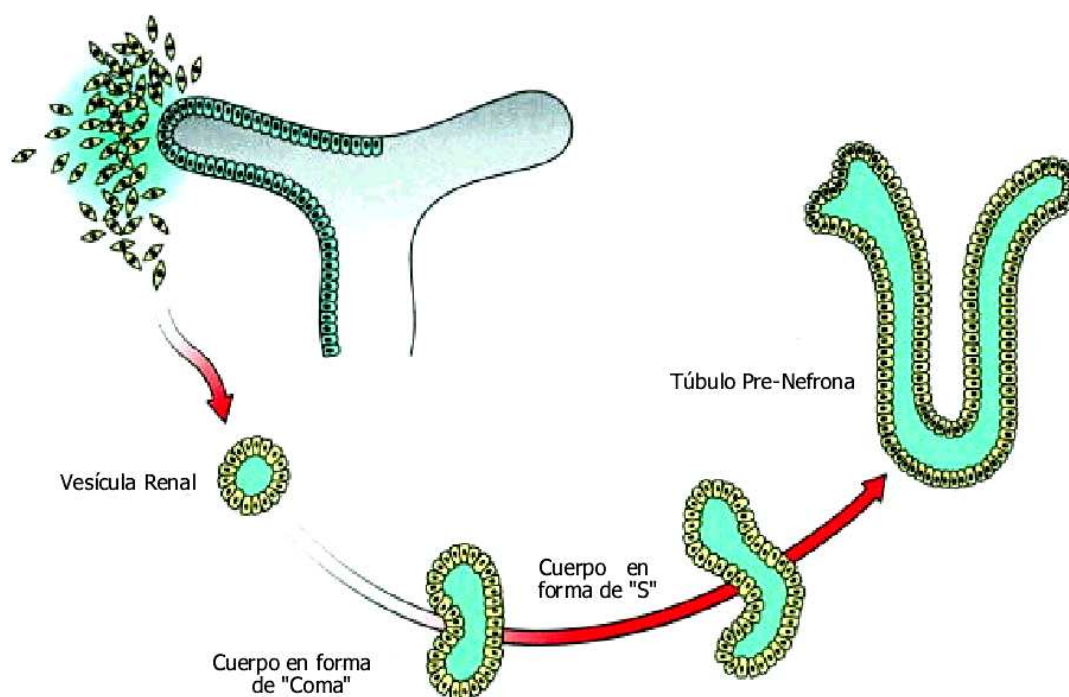
Gran parte de la información acerca de la patología molecular de las neoplasias de la edad pediátrica deriva del estudio de la embriogénesis en el humano.<sup>135</sup> En este mismo contexto, el entendimiento del desarrollo normal y anormal del riñón facilita el conocimiento de los eventos moleculares que participan en la oncogénesis renal.<sup>228</sup> Las similitudes entre el

crecimiento, la cito diferenciación y la migración celular, y la desregulación de dichos eventos son evidentes a nivel fenotípico. La relación que existe entre estos dos sucesos es manifiesta pues la proliferación celular masiva, la migración y la diferenciación celulares son características morfológicas comunes a la embriogénesis y al desarrollo de las neoplasias primitivas de la edad pediátrica.<sup>185,227</sup> A nivel molecular, estas características morfológicas se explican con el descubrimiento de los proto-oncogenes que codifican componentes de señales de transducción.<sup>190,221</sup>

### ***Nefrogénesis***

El desarrollo del riñón en los humanos comienza en la semana 4-5 de gestación.<sup>96</sup> Como la mayoría de los órganos sólidos de origen epitelial, el riñón sigue un esquema simple de organogénesis, es decir, una hoja o estructura tubular simple de células epiteliales entra en un proceso secuencial de ramificación para formar una estructura arborizante semejante a las ramas de un árbol.<sup>52</sup> Las estructuras del riñón, que básicamente están formadas por la nefrona, los vasos sanguíneos y el intersticio, derivan de dos estructuras embrionarias diferentes; por un lado, el glomérulo y la porción proximal de los túbulos colectores están originados en el blastema renal, mientras que la porción más distal de los túbulos colectores y el uréter se desarrollan a partir de la yema ureteral.<sup>202</sup> Estas dos estructuras embriológicas interactúan entre sí de manera que el blastema renal es inducido a entrar en un proceso crítico de transformación mesénquimo-epitelial, y la yema ureteral es inducida a ramificarse hasta formar una estructura arborescente. El mesénquima metanéfrico está constituido por una red laxa de mesénquima conocida como blastema renal, cuyo origen es el mesodermo intermedio.<sup>43</sup> La yema ureteral se origina de la porción caudal del conducto de Wolff y se dirige en sentido cefálico hacia el blastema renal, al cual penetra. Este evento induce la migración de las células mesenquimales, haciendo que se acerquen más unas a otras y se preparen para su subsiguiente conversión en células epiteliales. Inicialmente, las células mesenquimales se condensan alrededor de la yema ureteral para, posteriormente, hacerlo alrededor de cada una de las ramas originadas en la yema ureteral.<sup>210</sup> Eventualmente estas células mesenquimales se convierten en células epiteliales y llegan a formar una estructura esférica llamada vesícula renal. La vesícula renal cambia su forma, primero toma forma de “coma”, y después adopta forma de “S”, lo que, posteriormente, en el adulto formará un túbulo. La estructura en forma de “S” pronto aumenta de longitud, para formar los túbulos proximal y distal. La punta del túbulo es invadida por células endoteliales y

forma el ovillo vascular del glomérulo (Fig. 1). Todos estos eventos aparentan ser simples y monótonas cuestiones de cinética celular, sin embargo, detrás de esto se esconde una compleja, activa y continua red de intercambio de información entre las células primitivas.<sup>6</sup> La información regula el proceso de migración y diferenciación celular. El desarrollo del tejido embrionario depende de la interacción entre las células y los tejidos que las rodean, un sinnúmero de señales se secretan *in situ* y sirven para regular el destino de las células y su diferenciación, además contribuyen a reorganizar los epitelios y los tejidos mesenquimatosos.<sup>113</sup> La regulación de estos procesos implica la participación de diferentes proteínas de unión, factores de transcripción, factores de crecimiento y sus receptores, así como proto-oncogenes que actúan como receptores de factores de crecimiento y características celulares específicas.<sup>12</sup> Todas estas moléculas modulan, además, las glicoproteínas de la matriz extracelular, sus receptores, moléculas de adhesión, proteínas del citoesqueleto y enzimas degradadoras de la matriz extracelular. El proceso completo de nefrogénesis está gobernado por un patrón de expresión génica que continuamente está cambiando, por lo que cada paso de la embriogénesis es crítico, las mutaciones que afectan a proto-oncogenes o factores de transcripción pueden originar una malformación o una neoplasia.<sup>35</sup>



**Figura 1.** Esquema representativo del proceso de nefrogénesis.<sup>73</sup>

## ***Polaridad Celular***

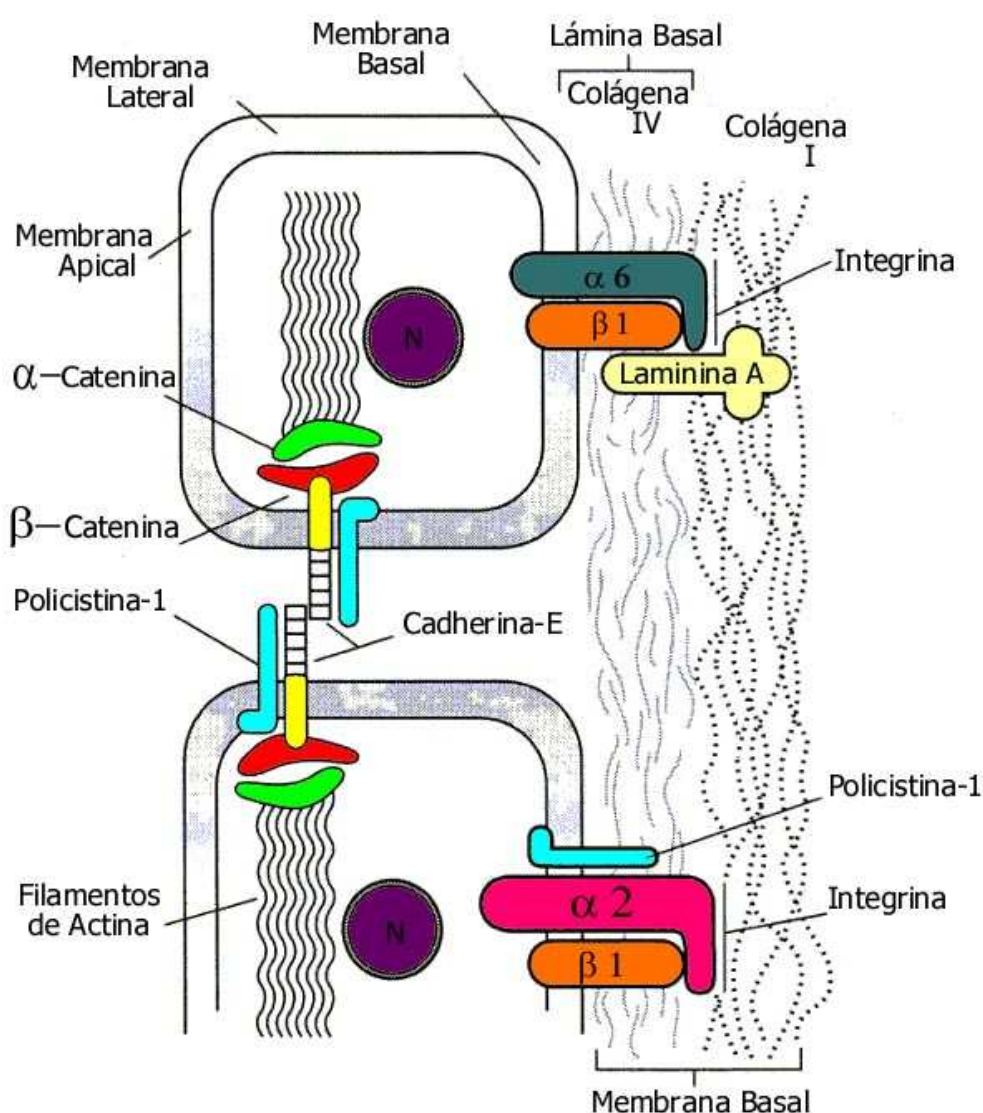
El proceso de conversión de células mesenquimatosas en células epiteliales requiere la expresión de moléculas de adhesión, la condensación y la polaridad celular. Este proceso de transformación epitelio-mesénquima se realiza desde las primeras fases de la diferenciación tisular en la vida embrionaria (formación del paladar) y también es un proceso que ocurre en numerosos tumores pediátricos (incluido el nefroblastoma) y de adulto, incluidos los carcinomas con transformación sarcomatosa y los melanomas.<sup>7</sup> La polaridad celular se refiere al hecho de que ciertos receptores de membrana se localizan exclusivamente en un determinado lado de la membrana celular.<sup>127,134,247</sup> Por ejemplo, las células mesenquimatosas no están polarizadas, por lo que los receptores de membrana celular están localizados al azar en toda la superficie celular. Para que las células mesenquimatosas se conviertan en células epiteliales se requiere que estén presentes ciertas moléculas de adhesión.<sup>8</sup> Las moléculas de adhesión tienen un papel muy importante en la orientación y la polaridad celular. En el caso de las células epiteliales, las moléculas de adhesión se localizan a los lados y en la parte basal de las células donde éstas se unen una a otra, y donde se adhieren a la lámina basal.<sup>23,66,68,76,155,196,245</sup>

## ***Moléculas de Adhesión***

Las células epiteliales producen moléculas de adhesión. Estas moléculas forman una súper-familia de moléculas que incluyen las integrinas, las cadherinas y las cateninas. En etapas tempranas de diferenciación epitelial, la cadherina-E se expresa ya en las células epiteliales.<sup>38,70</sup> Está localizada en las caras laterales de la membrana celular y desempeña un papel muy importante en la adhesión célula-célula. La ablación de tal molécula de adhesión puede producir apoptosis.<sup>14</sup> Conforme las células maduran y los túbulos se desarrollan, cada una de las células epiteliales adquiere propiedades específicas y expresa diferentes tipos de cadherinas dependiendo de su posición en la unidad renal funcional, o nefrona. Las cadherinas interactúan entre sí dentro y fuera del citoplasma. Es conocida la presencia de filamentos intermedios como parte del citoesqueleto celular; este citoesqueleto, aun cuando está localizado dentro del citoplasma, acepta y comparte información con el exterior.<sup>182,183</sup> Los filamentos de actina pueden encontrarse en todo el citoplasma, estos están unidos a las cateninas -moléculas de adhesión localizadas dentro del citoplasma- que, a su vez, se encuentran unidas a la cadherina-E.<sup>89,131</sup> Las células epiteliales de la futura nefrona están rodeadas por una compleja



matriz de tejido conectivo laxo que, con ayuda de las moléculas de adhesión, es capaz de hacer que una hoja de células epiteliales se doble y forme un túbulo; además, ayuda a la orientación y polarización celular e influye en la migración celular.<sup>71</sup> Las integrinas son moléculas de adhesión que participan también en el desarrollo del riñón, y son receptores de la superficie celular, localizados en la porción basal celular, que interactúan con la matriz extracelular a través de la unión de la célula epitelial y la lámina basal. Estas moléculas interactúan con colágena I, colágena IV y laminina.<sup>112</sup> Se ha reportado que las integrinas, aunque se localizan en la membrana basal, influyen en la regulación de las uniones de las cadherinas (Fig. 2).



**Figura 2.** Esquema representativo de las moléculas de adhesión que intervienen en la nefrogénesis.<sup>73</sup>

## *Apoptosis*

La nefrogénesis es una mezcla de eventos continuos de proliferación celular y apoptosis. La apoptosis continua del mesénquima metanéfrico conduce a agenesia, hipoplasia o displasia renal. Si la apoptosis está anormalmente disminuida puede asociarse con el desarrollo de una neoplasia o de la Enfermedad Poliquística Renal.<sup>126</sup> Así mismo, la apoptosis se ha relacionado con la vía Wnt.<sup>118</sup>

## GENES QUE CONTROLAN LA ORGANOGÉNESIS

### *Factores de Transcripción*

Los factores de transcripción son productos proteicos de genes de transcripción. Se unen al ADN y controlan la expresión de otros genes.<sup>166</sup> Regulan el proceso por el cual un gen se transcribe a una secuencia complementaria de ARN, iniciando el proceso de producción de una proteína. Ejemplos de factores de transcripción que actúan en la nefrogénesis son WT1 y PAX2. WT1 es uno de los genes más importantes que controlan la organogénesis y sus características serán comentadas posteriormente cuando se aborde la biología molecular del tumor de Wilms.

- **Factor Neurotrópico Derivado de la Línea Celular Glial (GDNF)**

El factor neurotrópico derivado de la línea celular glial (GDNF, por sus siglas en inglés) ha sido asociado a proliferación, diferenciación y migración neuroblástica. En el riñón, las células mesenquimales producen GDNF al mismo tiempo que se expresa el gen *WT1*, justo antes de que se forme la yema ureteral. GDNF forma un complejo junto con su receptor GDNFR alfa y RET. Una vez que se completa este complejo, se activa el gen *WNT-11* y puede detectarse RET en la porción caudal del conducto de Wolff, cerca de donde se origina la yema ureteral,<sup>20</sup> al igual que en la punta de la yema ureteral, y en las puntas de sus ramificaciones. Este complejo es un potente inductor de la señal para la formación y el crecimiento de la yema ureteral en el riñón humano. En roedores con ausencia del gen *GDNF* se ha observado agenesia renal bilateral. Así mismo, y también en roedores, pero con ausencia de *RET*, pueden observarse riñones pequeños y displásicos e incluso agenesia renal.

- ***PAX2***

La familia *PAX2* representa un grupo de genes de señalización fuertemente involucrados en la organogénesis. Los nueve miembros de esta familia funcionan como reguladores de la transcripción. *PAX2* se expresa durante la formación del metanefros, y puede identificarse en las células mesenquimales primitivas, precursoras de las células epiteliales, justo antes de su conversión. También está presente en el conducto de Wolff, en la punta de la yema ureteral y en las puntas de sus ramas. La expresión de *PAX2* es precedida de la de *WT1*. La función de *PAX2* está relacionada con la promoción de las células mesenquimales a células epiteliales y, probablemente, con la supervivencia de estas últimas. En estudios de experimentación animal, se ha observado que los ratones knock-out para el gen *PAX2* presentan apoptosis y crecimiento renal limitado; así mismo, mediante cultivo *in vitro* de células renales embrionarias en las que se inhibe la función de *PAX2*, se ha encontrado que la conversión de las células mesenquimales en células epiteliales depende de los niveles de *PAX2*.<sup>174</sup> En el humano, un defecto de la expresión de *PAX2* se observa en el síndrome Renal-Coloboma;<sup>53</sup> los pacientes con este síndrome presentan ceguera e hipoplasia renal unilateral.

### ***Genes Wnt***

La familia *Wnt* comprende un grupo de genes de señalización que tiene una función muy importante en la organogénesis.<sup>10,19,260</sup> Este grupo de genes determina la estructura interna de un órgano o determina la detención del crecimiento cuando el órgano ha alcanzado su tamaño apropiado. Otras funciones en las que se involucra a estos genes incluyen la polaridad celular, la reestructuración celular<sup>79</sup> y el desarrollo axial.<sup>139</sup> En el riñón en desarrollo, *WNT4* actúa como gen transcripcional y de señal que guía el desarrollo de los túbulos renales;<sup>241</sup> así mismo facilita la producción y estabilización de una molécula de adhesión, la  $\beta$ -catenina,<sup>54</sup> y es necesario para la transformación del blastema metanéfrico en células epiteliales. Su función es la de ayudar a las células epiteliales a adherirse unas a otras y a alinearse de tal manera que formen estructuras tubulares.<sup>240</sup> La expresión de *WNT4* puede observarse desde el estadio en el que los túbulos rudimentarios son vesículas y conforme estas vesículas se convierten en túbulos,<sup>49</sup> y esta expresión aumenta gradualmente. Como ya se mencionó anteriormente, la expresión del gen *WT1* precede a la de *PAX2* y, a su vez, la expresión de *WNT4* se detecta después de que se exprese este complejo. Mientras que *PAX2* promueve la conversión de células mesenquimales en epiteliales, *WNT4* parece ayudar a la orientación y adhesión

celulares, así como a la formación de futuros túbulos.<sup>104</sup> Además, la expresión de este complejo desaparece conforme la nefrona en desarrollo madura; es decir, la expresión de estos tres genes desaparece primero en la región medular, y va disminuyendo su expresión conforme se acerca a la corteza, la zona nefrogénica más activa.

### ***Factores de Crecimiento (Citoquinas)***

Existen más de 50 factores de crecimiento conocidos también como citoquinas, cada uno de ellos tiene un receptor de membrana específico. Algunos receptores actúan para más de un factor de crecimiento; igualmente, los factores de crecimiento actúan sobre más de un blanco, pero son nombrados según el primer órgano en el que fue descrita su función. Actúan principalmente sobre la proliferación celular aunque tienen también otras funciones tales como la diferenciación, la supervivencia y la migración celulares; así mismo, pueden inducir o inhibir la división celular, prolongar la vida de una célula y suprimir la apoptosis.

Los factores de crecimiento se unen a receptores de la superficie celular e inician la fosforilación.<sup>168</sup> Entre los factores de crecimiento asociados con el desarrollo renal se incluyen el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) I y II, el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) B, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de respuesta temprana (EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 y 7.<sup>241</sup> En la mayoría de los casos, los factores de crecimiento se unen a un receptor de tipo tiroquinasa. Estos factores pueden ser producidos en el mesénquima renal y actuar sobre células vecinas (función paracrina), actuar en células distantes (función endocrina) o sobre la misma célula (función autocrina). El factor de crecimiento transformante inhibe la morfogénesis, la conversión de células mesenquimatosas en células epiteliales, y la tubulogénesis. Algunas de estas actividades son realizadas de manera indirecta al inhibir otros factores de crecimiento que inducen estos eventos. En los roedores, el factor de crecimiento de hepatocitos, el factor semejante a la insulina I y II, el factor de crecimiento transformante, el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento temprano estimulan el desarrollo de la nefrona.<sup>218</sup> En el ámbito renal la función de estos factores de crecimiento es compleja. Los receptores para los factores de crecimiento pueden funcionar para uno o más factores de crecimiento. Además, los factores de crecimiento pueden tener uno o más blancos, es decir, pueden inducir la proliferación celular de células de origen mesenquimatoso o

epitelial, por lo que el desarrollo renal puede ser completado aun cuando un factor de crecimiento sea por alguna razón deshabilitado.

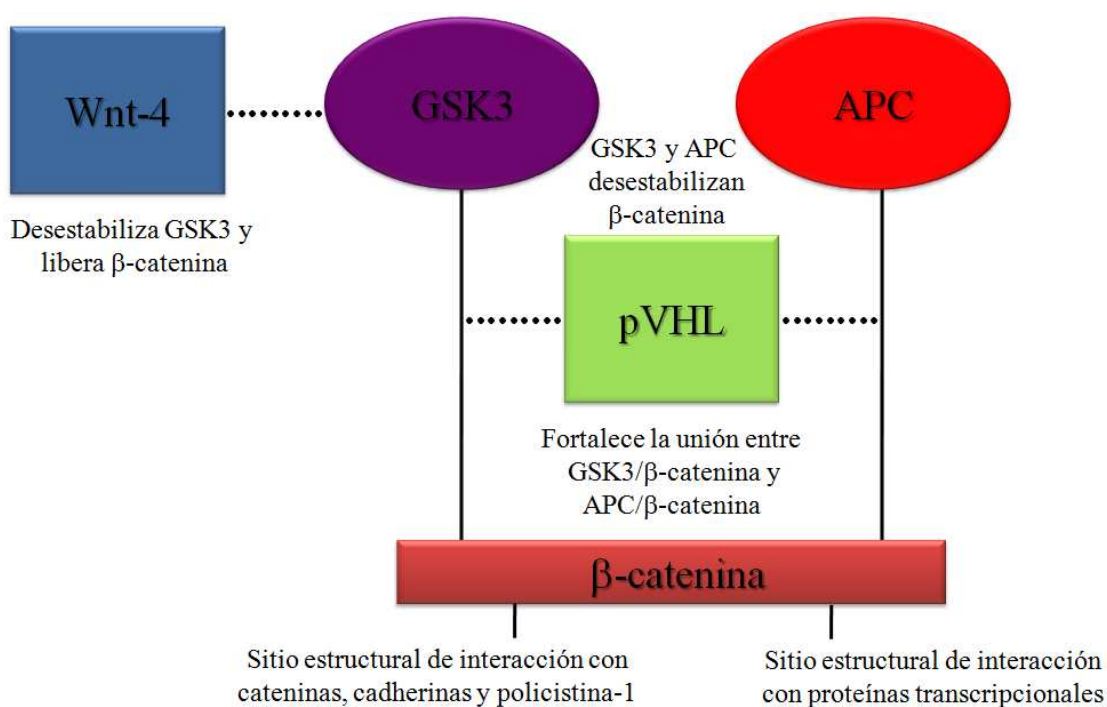
### ***Beta-Catenina***

El producto génico más importante de Wnt4 es la molécula de adhesión beta catenina.<sup>241</sup> Ésta se encuentra en la membrana celular, en el citosol y en el núcleo de las células, y presenta funciones específicas diferentes en cada uno de estos sitios. Como molécula de adhesión de membrana celular, su función es la de translocar proteínas de transcripción desde el citoplasma hacia el núcleo, acelerar el proceso de transcripción que regula la expresión genética y el destino de las células<sup>15,36,111,125</sup> y, además, influir en la migración celular.<sup>163</sup> Cuando la  $\beta$ -catenina se expresa en la parte interna de la membrana celular, forma un puente entre cadherina-E y  $\alpha$ -catenina,<sup>56,176</sup> de esta forma las células se unen entre sí, pero también, el complejo de  $\beta$ -catenina/cadherina sirve como medio de comunicación entre las células y su micro ambiente, es decir, facilita el envío de señales entre las células y la matriz celular.<sup>158,235</sup> Aunque  $\beta$ -catenina tiene múltiples sitios de unión, su estabilidad depende en gran parte de las moléculas a las que se une. Entre estas moléculas que afectan a la actividad de  $\beta$ -catenina se encuentran Wnt 4, VHL y policistina,<sup>117</sup> moléculas conocidas por tener efectos en el desarrollo renal tanto en roedores, como en el humano.

Beta-catenina también se une a un número de proteínas transcripcionales, cuando esto ocurre migra hacia el núcleo donde realiza actividades de tipo transcripcional.<sup>4</sup> Una vez que se localiza en el núcleo, beta catenina estimula, además, su propia síntesis. Puede entonces entenderse como beta catenina realiza múltiples actividades debido a sus múltiples receptores. La molécula Wnt4 estimula la actividad de  $\beta$ -catenina al desestabilizar a la glucógeno sintetasa quinasa-3, lo que permite que  $\beta$ -catenina funcione como factor de transducción.

Por otro lado, existen moléculas a las cuales se une  $\beta$ -catenina y tienen un efecto negativo al disminuir su actividad. Las dos moléculas principales que actúan de manera negativa son la glucógeno sintetasa quinasa (GSK3)<sup>61,105</sup> y el gen de la poliposis adenomatosa colónica (*APC*).<sup>59</sup> Cuando  $\beta$ -catenina está unida a GSK3 o a *APC*, es degradada y enviada fuera del citosol; al mismo tiempo, el gen Von Hippel Lindau (*VHL*) fortalece la unión entre  $\beta$ -catenina y las moléculas que ejercen función negativa sobre ella; de esta manera, disminuye de

forma importante la disponibilidad de  $\beta$ -catenina en el citosol<sup>99</sup> (Fig. 3). Como puede notarse, la función de  $\beta$ -catenina es de suma importancia en la nefrogénesis, al igual que lo es en el desarrollo del tumor de Wilms.<sup>230</sup> De hecho, se cree que cualquier defecto en los eventos que suceden a manera de cascada desde la expresión de Wnt4 hasta la síntesis de  $\beta$ -catenina puede provocar el desarrollo de un tumor.<sup>242</sup>



**Figura 3.** Imagen representativa de la relación entre  $\beta$ -catenina y sus ligandos.<sup>73</sup>

### ***Policistina***

Las Policistinas 1 y 2 (PKD-1, PKD-2) son los productos proteicos del gen de la enfermedad poliquística renal. El primero de ellos ha sido identificado en las fases tempranas del desarrollo renal, específicamente cuando la yema ureteral tiene forma de coma o de “S”. Así mismo, se le involucra en la elongación y maduración de las estructuras tubulares. Tiene un efecto positivo sobre  $\beta$ -catenina al aumentar su disponibilidad. Además, se cree que comienza la cascada de eventos que inician la interacción de las células y la matriz extracelular, pues en la membrana plasmática interactúa tanto con el complejo cadherina E-

beta-catenina, como con el complejo alfa-beta integrina/colágena IV y V. Estos complejos tienen funciones celulares importantes como son la proliferación y la polaridad celular.<sup>120</sup> Si existe una mala función de Policistina 1, como en el caso de la enfermedad poliquística renal, tiene lugar una proliferación anormal con formación de quistes. Además, también se afectan ciertas funciones de la membrana celular. Siguiendo con el ejemplo de la enfermedad poliquística renal, la pérdida de la polaridad celular origina la alteración de la función del complejo cadherina-E/ $\beta$ -catenina. Este complejo dirige una red que contiene la molécula anykrina, que está normalmente localizada en el lado basal y lateral de la célula donde se une a la sodio potasio ATP-asa. En condiciones anormales, el complejo cadherina-E/ $\beta$ -catenina la guía de manera anómala a la superficie luminal de la célula y como consecuencia un fluido acuoso puede ser secretado hacia el lumen, que es lo que se cree que sucede cuando se forma un quiste.

### ***Inductor del Metanefros***

El proceso molecular por el cual la yema ureteral estimula e induce la formación del metanefros, es decir, la transformación del mesénquima primitivo en tejido epitelial, es parcialmente desconocido. Se sabe que para que este proceso se lleve a cabo es necesaria la estimulación por parte de la yema ureteral;<sup>74</sup> sin embargo, las sustancias que se supone están involucradas en este proceso no se conocen a ciencia cierta. Mediante estudios *in vitro*, se ha observado que cuando se colocan células primitivas mesenquimales sin presencia de yema ureteral el proceso de transformación no ocurre. En un estudio en el que añadieron yema ureteral al tejido mesenquimal, pero quedando ambos separados por un microfiltro, se observó la transformación del mesénquima en tejido epitelial, aun cuando no existió contacto directo entre las células. De estos estudios se concluye que existe algún factor molecular responsable de esta transformación. Como mejores candidatos para esta función se ha designado a un gran grupo de moléculas, entre las que se incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos 2, el factor inhibitorio leucémico, el gen SHH (sonic hedgehog) y EMX-2, entre otros.<sup>251</sup>

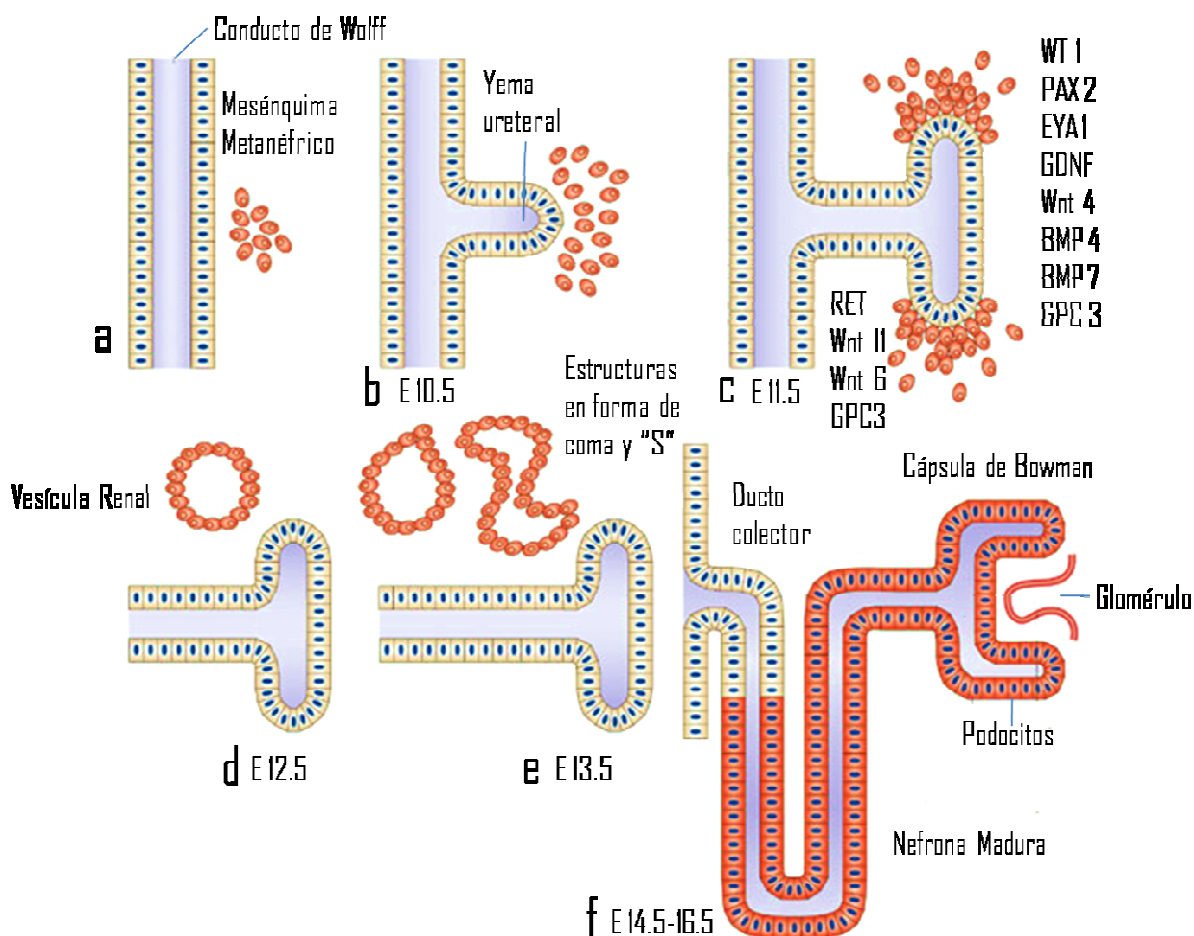
## **INTEGRACIÓN DE LOS EVENTOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA NEFROGÉNESIS**

Después de comentar las diferentes moléculas que están directa o indirectamente involucradas en la nefrogénesis, hemos de mencionar los procesos morfológicos y su

contraparte molecular. Durante la cuarta semana de gestación, se identifican un grupo de células mesenquimales primitivas distribuidas de manera laxa que expresan factor de crecimiento semejante a la insulina, el cual estimula su supervivencia y evita así su apoptosis. El metanefros humano aparece alrededor de la quinta semana de gestación y debería desaparecer alrededor de la semana 36 de la gestación.<sup>28</sup> Alrededor del día 28 estas células comienzan a expresar WT1 y factor neurotrópico derivado de la línea celular glial; para esta fecha el ducto de Wolff ha crecido en dirección caudal, dirigiéndose hacia la cloaca (pasando por las fases de pronefros, mesonefros y por ultimo metanefros). En el conducto de Wolff, RET comienza a expresarse y el mesénquima primitivo se alinea alrededor del conducto de Wolff,<sup>207</sup> pero en un lugar distante al que ocupará, en un futuro, la yema ureteral; de esta forma se evita la producción de Wnt11 y, con ello, se evita también la formación de la yema ureteral en un sitio no apropiado. A continuación, GDNF induce la formación de la yema ureteral en su sitio correcto. Conforme la yema ureteral se desarrolla, ésta envía información al blastema renal (probablemente a través del factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2) lo cual provoca que las células mesenquimales se condensan alrededor de la yema uretral. Una vez que la yema ureteral penetra en el blastema renal, éste se condensa alrededor de las puntas de la yema y alrededor de sus ramificaciones. Algunas células no se condensan sino que más bien se distribuyen de manera más laxa, estas células expresan el gen BF-2 y están destinadas a formar células estromales.

Otro grupo de células con diferenciación estromal y que expresa factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) está destinado a formar la red vascular renal.<sup>238</sup> Este grupo celular inicia la expresión de diferentes moléculas que ayudarán a la conversión de mesénquima en tejido epitelial y entre estas moléculas se encuentran PAX2, EMX-2 y LIF. Estas moléculas estimulan la expresión de WNT4, BCL2 y BMP7 e inhiben la apoptosis de las células pre-epiteliales y epiteliales. Una vez iniciado el proceso de conversión, las células estromales sintetizan la matriz extracelular que albergará el componente epitelial (laminina y colágena I y IV). En este punto, el receptor de membrana celular de integrina se une a la laminina A, y las colágenas I y IV se unen a la lámina basal. Al mismo tiempo, la molécula sodio potasio ATPasa, así como el receptor del factor de crecimiento epidérmico, se localiza en la membrana celular basal-lateral, se regula el complejo cadherina-E/beta-catenina/cito esqueleto, y se completan las uniones intercelulares.<sup>75,248</sup> Con estos eventos las células adquieren su polaridad, se inicia la tubulogénesis, y la nefrona comienza a tomar forma (Fig 4).





**Figura 4.** Representación esquemática de la integración de los eventos morfológicos y moleculares de la nefrogénesis.<sup>193</sup>

Un evento interesante ocurre cuando las células pierden la expresión de vimentina y comienzan a expresar citoqueratina -filamento intermedio característico de las células epiteliales-; a continuación, WNT4 desestabiliza GSK3 y se libera  $\beta$ -catenina, que migra hacia la membrana celular para formar una unión entre cadherina-E, alfa-catenina y los filamentos del citoesqueleto;<sup>231</sup> *PKD-1* y 2 producen policistina 1 y 2; la policistina 2 transloca la policistina 1 hacia la superficie celular donde se une al complejo  $\alpha$ -catenina/ $\beta$ -catenina/Cadherina-E; este complejo influye en WNT4 y en las uniones intercelulares; finalmente, la  $\beta$ -catenina es translocada al núcleo donde acelera el proceso de transcripción. Las células estromales que se condensan alrededor de la yema ureteral forman primero una esfera o vesícula, la cual va tomando forma, primero de coma y luego de "S", se alarga y establece las diferentes partes de la nefrona. El factor de crecimiento vascular

endotelial ejerce sus efectos, y el proceso de vascularización comienza sobre el extremo proximal de la nefrona en desarrollo. En respuesta a la angiotensina II y a su receptor (AT1), el glomérulo madura y el sistema arteriolar se desarrolla. Por su parte, el mesangio toma su forma gracias a los efectos del factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La porción más distal de la nefrona se fusiona con el sistema colector -el cual es el resultado de la ramificación progresiva de la yema ureteral-, y el lumen y la membrana basal se alinean para tener continuidad. Las nefronas más cercanas al hilio maduran primero, mientras que las de la porción periférica lo hacen después dejando una patente zona nefrogénica activa, la cual terminará su diferenciación alrededor de la semana 36 de gestación. A medida que el tallo de la yema ureteral se va alargando -éste termina por formar el uréter-, la luz de éste queda obliterada temporalmente para luego recanalizarse, primero en su parte media, después en la proximal y, finalmente, en el tercio distal (Fig. 4).

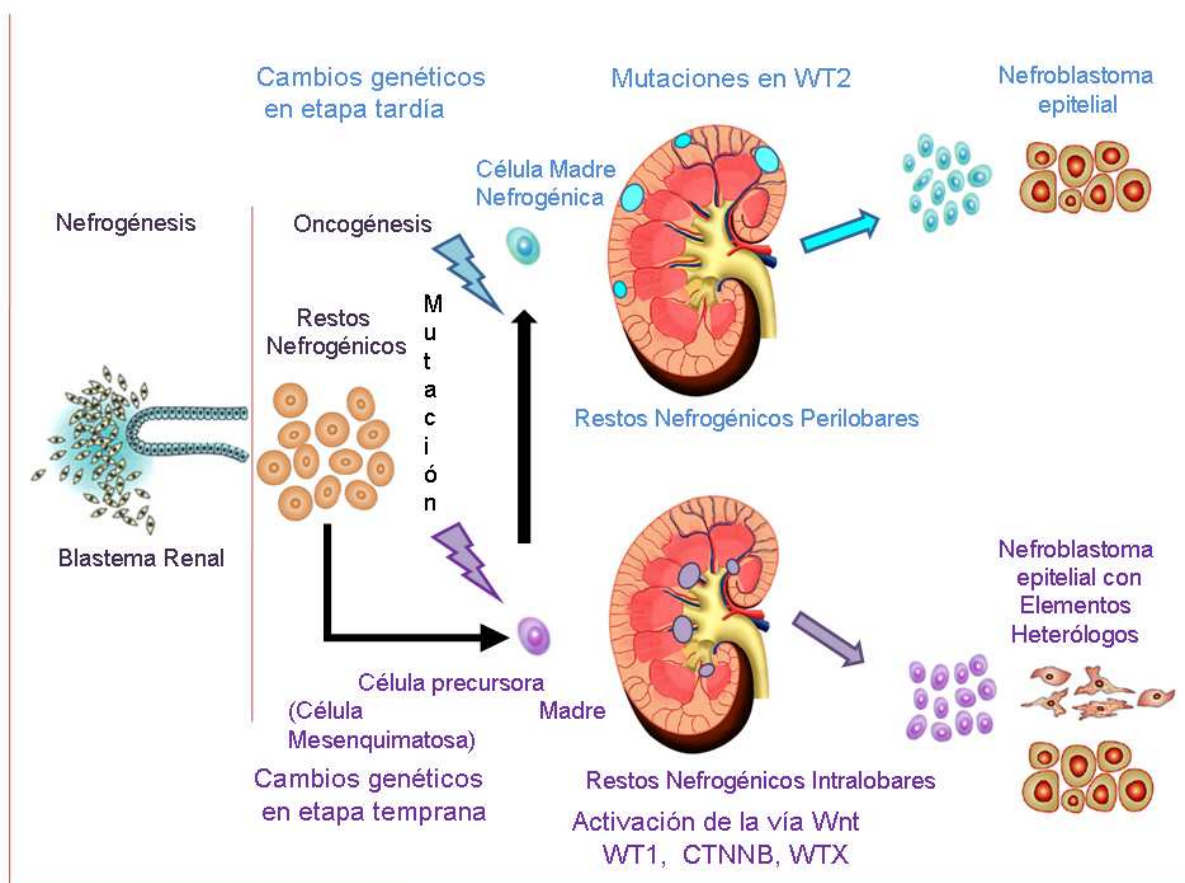
## TUMOR DE WILMS

### *Biología Molecular del Tumor de Wilms*

El tumor de Wilms es el tumor sólido más frecuente de la edad pediátrica y afecta a 1 de cada 10.000 niños.<sup>50</sup> Típicamente, el nefroblastoma se origina en pacientes entre los 2 y los 4 años de edad. Hasta la fecha, ningún factor ambiental ha sido relacionado con el desarrollo del tumor de Wilms. En su lugar, hay algunos síndromes dismórficos -los cuales también se han encontrado en ciertos tumores disembrionarios genitourinarios incluidos los gonadoblastomas-,<sup>164</sup> así como alteraciones genéticas que se conocen como predisponentes y confieren un alto riesgo de desarrollar dicho tumor. Estas observaciones sugieren un mayor protagonismo de los factores genéticos en las causas de la génesis tumoral.<sup>41</sup> Por lo tanto, el nefroblastoma es un claro ejemplo de la pérdida del control de la regulación del desarrollo tisular y del desarrollo de una neoplasia.<sup>3</sup> El conocimiento sobre la patología molecular de este tumor en particular se basa en los hallazgos de las investigaciones realizadas en la nefrogénesis, así como en las investigaciones dirigidas a estudiar los síndromes dismórficos asociados a esta neoplasia.

El nefroblastoma se origina en el metanefros, el riñón definitivo en los mamíferos. Se presume que los remanentes de blastema metanéfrico residual en el riñón que no degeneran mediante apoptosis son los responsables del desarrollo del tumor de Wilms. Aunque la pérdida

del control de la diferenciación del blastema renal es característica del tumor de Wilms, las células primitivas retienen parte del potencial de diferenciación, como lo testifican las características morfológicas observadas en el tumor de Wilms clásico o trifásico, donde se observan componentes epiteliales -incluyendo túbulos inmaduros y glomérulos de aspecto abortivo-, componentes estromales y blastemales.<sup>98</sup> (Fig. 5).



**Figura 5.** Esquema hipotético del desarrollo del nefroblastoma. La nefrogénesis es el resultado de numerosos eventos moleculares coordinados tanto en tiempo como en espacio. Cambios mutacionales pueden alterar los pasos cruciales del desarrollo renal y, por lo tanto, facilitar el desarrollo de una neoplasia. Se presume que el nefroblastoma es originado por una célula madre que posee la característica de tener dos estadios de maduración. Esta célula madre es la que constituye los restos nefrogénicos frecuentemente observados en el nefroblastoma. Los restos nefrogénicos intralobares (RNI), localizados cerca del seno renal, y los restos nefrogénicos perilobares (RNP), alojados en la periferia del riñón, indican que los cambios genéticos ocurren temprano y de manera tardía respectivamente. Además, mientras que los RNI frecuentemente exhiben elementos mesenquimales heterólogos, los RNP solo presentan elementos epiteliales maduros. La activación de la vía WNT no ha sido identificada en los RNP.

Otros tumores demuestran predominio de componentes estromales o blastemales. Esto

queda apoyado por la creencia de que el tumor de Wilms se origina por un estado pre-maligno conocido como restos nefrogénicos, tejido renal inmaduro que persiste después de la semana 36 de gestación (Fig. 5). Aunque sólo se identifican restos nefrogénicos en el 1% de las autopsias pediátricas, estos sí se observan en alrededor del 30% de los tumores de Wilms de tipo esporádico, y todavía son más frecuentes en aquellos asociados a síndromes con predisposición genética, o en los tumores congénitos y bilaterales.<sup>16</sup>

### ***Genes Asociados al Tumor de Wilms***

El descubrimiento de anomalías citogenéticas en los síndromes asociados al tumor de Wilms, tales como deleciones en 11p13 en el síndrome WAGR, trisomía parcial 11p15, y translocaciones en el síndrome de Beckwith-Wiedemann,<sup>82</sup> llevaron a la identificación de los genes *WT*. Adicionalmente, otros estudios han identificado otros loci genéticos como responsables de la oncogénesis del nefroblastoma.

- ***WT1***

En estado normal el gen *WT1* regula la proliferación celular pero cuando existe una mutación se convierte en un oncogén capaz de inducir proliferación celular de las células neoplásicas y, por tanto, el desarrollo de un tumor, como es el caso del tumor de Wilms.<sup>268</sup> En el riñón humano, el gen *WT1* se expresa en las células mesenquimatosas justo antes de la formación de la yema ureteral. Antes de que las células primitivas expresen este gen, se detecta la expresión del factor de crecimiento semejante a la insulina en grandes cantidades, lo cual previene la apoptosis e induce la proliferación de las células mesenquimales. Una vez que *WT1* comienza a expresarse, se suprime el factor de crecimiento semejante a la insulina y, como resultado, las células mesenquimales comienzan a agruparse. Este es el primer paso que indica que el proceso de conversión de células mesenquimales en células epiteliales ha comenzado. *WT1* sigue expresándose después de que las células mesenquimatosas se han transformado en epiteliales. Este hecho concuerda con el elevado porcentaje de mutaciones observadas en este gen en el tumor de Wilms (20% de los casos). Además, *WT1* también se ha relacionado con dos grupos diferentes de síndromes dismorfogénicos; los pacientes que presentan alguno de estos dos síndromes tienen, además, predisposición a desarrollar tumor de Wilms.<sup>11</sup> El primero de ellos es conocido como síndrome de Denys-Drash, que incluye genitales ambiguos, estrías gonadales e insuficiencia renal. El segundo síndrome, llamado WAGR (por sus siglas en

inglés), cursa con aniridia, defectos genitourinarios, retardo mental y predisposición a desarrollar un tumor de Wilms. En la mayoría de los tumores de Wilms, y especialmente en aquellos con mutaciones del gen *WT1*, se pueden detectar niveles altos de factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF 2), pues como se mencionó anteriormente, la expresión del gen *WT1* en condiciones normales suprime los niveles del factor de crecimiento semejante a la insulina. De esta forma, una mutación del gen *WT1* promueve la proliferación del blastema renal. Por otro lado, también pueden identificarse niveles altos de factor de crecimiento semejante a la insulina en tumores de Wilms sin defectos en el gen *WT1*. El ejemplo de esta situación se evidencia en el síndrome de Beckwith-Wiedemann,<sup>115,143</sup> en donde se observa macrosomía, macroglosia, hemihipertrofia corporal, hipoglicemia y retardo mental. En este síndrome se ha comprobado que la elevación de este factor de crecimiento (IGF 2) es secundaria a un defecto genético representado por una banda extra muy cerca del gen que codifica para la expresión de IGF 2. Este gen es conocido como *WT2* y está localizado en la banda 15.5 del brazo corto del cromosoma 11.<sup>188</sup> La visceromegalia observada en estos pacientes pudiera tener relación con los altos niveles de IGF 2. Recientemente también se ha encontrado mutación de *WT1* en pacientes pseudohermafroditas con glomerulopatía y gonadoblastomas.<sup>84</sup>

El gen *WT1* está localizado en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 11 (11p13).<sup>102</sup> La existencia de un gen supresor de tumor como causante de este tumor fue descubierta por la presencia de deleciones en 11p13 en pacientes con síndrome WAGR. *WT1* consiste en 10 exones con un peso de 50kb que codifican múltiples isoformas proteicas. Las proteínas codificadas por *WT1* poseen un dominio transregulatorio rico en prolina y glutamina y un dominio C-terminal ADN/ARN que contiene cuatro dedos de zinc.<sup>25</sup> Los productos proteicos de *WT1* poseen actividad como reguladores de transcripción, estas proteínas pueden adherirse a la secuencia de ADN del factor semejante a la insulina 2 (IGF 2). Algunos otros genes están postulados como blancos de *WT1* debido a que poseen promotores ricos en prolina y glutamina, pero en presencia de un gen *WT2* defectuoso pueden detectarse niveles altos de IGF 2, lo que sugiere que IGF 2 es la principal diana de *WT2*. El resto de las dianas de *WT1* incluyen cadherina-E,<sup>80</sup> factor de crecimiento derivado de las plaquetas, syndecan, PAX2, DAX 1 y amfiregulina.

### ❖ *Efectos Biológicos de WT1*

Las investigaciones de los efectos biológicos de este gen lo colocan como un proto-oncogén; en su estado normal regula la proliferación y la división celular y la apoptosis. *WT1* se expresa ampliamente en el aparato genitourinario. Sin embargo, pueden detectarse niveles bajos de *WT1* en el metanefros en proceso de inducción y conforme este sufre diferenciación epitelial, los niveles aumentan. Una vez que se completa el proceso de diferenciación epitelial los niveles de *WT1* bajan y se atenúan. Estas observaciones indican que *WT1* posee función directa sobre las células con diferenciación epitelial. En ratones con un knock-out genético, el metanefros sufre apoptosis masiva lo que evita el desarrollo renal, demostrando un papel importante de *WT1* en la nefrogénesis.

### ❖ *Mutaciones de WT1*

En el humano, la delección de un alelo de *WT1* es responsable de malformaciones del tracto genitourinario en pacientes con síndrome WAGR (tumor de Wilms, aniridia, malformaciones genitourinarias y retardo mental), mientras que las mutaciones sin sentido producen defectos más graves en pacientes con síndrome de Denys-Drash (tumor de Wilms, genitales ambiguos, estrías gonadales y nefropatía) probablemente como consecuencia de un efecto negativo dominante de la proteína mutada. Por otra parte, sólo el 10 % de los tumores de Wilms esporádicos presentan una mutación sobre *WT1*, por lo que se cree que existen otros genes involucrados en el desarrollo de este tipo de neoplasias en estos tumores.<sup>271</sup> Así mismo, *WT1* también parece funcionar provocando la pérdida de función de un gen supresor de tumor; en este caso la mutación es un evento temprano pues se ha encontrado en restos nefrogénicos.

### ❖ *Otras Localizaciones de WT (Loci)*

**Cromosoma 11p15.** *WT1* es el único gen que ha sido clonado y caracterizado desde el punto de vista molecular. Su localización ha sido mapeada en 11p13, 11p15, 16q y 1p. La pérdida de heterozigocidad en los tumores de Wilms se observa hasta en un 50% de los casos, en algunos casos la pérdida de heterozigocidad se limita a la región 11p15.<sup>185</sup> En el síndrome de Beckwith-Wiedemann, caracterizado por hemihipertrofia corporal, macroglosia, omfalocele, citomegalia adrenal, macrosomía, hiperglicemia y predisposición a presentar tumor de Wilms, se han identificado mutaciones a este nivel.<sup>187</sup> En estos pacientes se observan niveles aumentados de IGF2, lo cual se cree secundario a una banda extra cercana a un gen

responsable de la síntesis de IGF2. Este gen se denomina *WT2* y está localizado en la banda 15.5 del brazo corto del cromosoma 11.

**Cromosoma 16q y 1p.** La pérdida de heterozigocidad ocurre en el 20 % de los casos de tumor de Wilms y está asociada a pobre pronóstico.<sup>212</sup> Los defectos en 1p son muy raros. Las mutaciones en 16q no se observan en restos nefrogénicos por lo que se deduce que la mutación en estos casos es un evento tardío.<sup>246</sup> Por estas observaciones se deduce que pueden existir más genes asociados al desarrollo de tumor de Wilms; sin embargo, no han sido caracterizados molecularmente de manera completa.

### ***Otros Genes Asociados al Tumor de Wilms***

- ***WTX y Glipican3***

Recientemente descrito, *WTX* es un gen localizado en Xq11.1, muy cerca del centrómero, y codifica una proteína de 1135 aminoácidos. *WTX* es un componente del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina y promueve su ubiquitinización y degradación, por lo que funciona como regulador negativo de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y, además, está relacionado con *WT1*.<sup>145,195</sup> El reporte inicial indica que se expresa en el 30% de los casos de tumor de Wilms que son negativos para *WT1*,<sup>87,194</sup> aunque un reporte más reciente indica que dicha expresión no es tan frecuente.<sup>175</sup>

*Glipican3* es un gen asociado con la morfogénesis y la regulación del crecimiento y se ha encontrado mutado en el síndrome Simpson-Golabi-Behmel,<sup>249</sup> otro síndrome que predispone al tumor de Wilms; así mismo, se han reportado mutaciones (pequeñas deleciones o mutaciones puntuales) en carcinoma hepatocelular, carcinoma gástrico y colonico.<sup>267</sup> Sin embargo, se requieren más estudios para dilucidar su función en el desarrollo del tumor de Wilms.

- ***p53***

Se sabe que el gen *p53* está ampliamente relacionado con el desarrollo de múltiples tumores en el humano, tiene una función conocida como gen supresor de tumores, específicamente como inductor de apoptosis. En el tumor de Wilms se observa sólo en el 20% de los casos y se asocia con aquellos tumores de histología desfavorable.<sup>40,200</sup>

## • Beta Catenina

En ausencia de moléculas de Wnt, la  $\beta$ -catenina es fosforilada por un complejo que incluye  $\alpha$ -casein-quinasa1 (CK 1),<sup>149,265,269</sup> glucógeno quinasa-sintetasa (GSK)-3 $\beta$ , proteína de la poliposis adenomatosa colónica (APC), axina y conductina.<sup>198,244,256</sup> La fosforilación de  $\beta$ -catenina es desencadenada por la fosforilación del residuo terminal serina 45, lo cual es realizado por CK 1 $\alpha$ , este evento activa (GSK)-3 $\beta$ , esta última molécula fosforila los tres residuos vecinos de beta-catenina, treonina 41, serina 37 y serina 33.<sup>173</sup> De esta forma, beta-catenina es entonces marcada por poliubiquitinización y posteriormente degradada a través de la vía proteosoma 26S. Con todo ello se obtiene baja disponibilidad de beta-catenina. Por otra parte, la activación del receptor a través de su unión con un ligando de Wnt permite la fosforilación de la proteína reguladora, la cual, a través de su interacción con axina, evita que GSK-3 $\beta$  fosforile a beta-catenina y, por lo tanto, permite su translocación hacia el núcleo donde beta-catenina cumple otra función.<sup>1,2,5</sup> Dentro del núcleo, beta-catenina interactúa con miembros de la familia Lef-1/TCF y genera el complejo factor de transcripción que causa la activación transcripcional de ciertos genes blanco (c-myc y ciclina D1). En ausencia de señal de Wnt, TCF actúa como represor de estos genes blanco.<sup>110,124</sup> La estabilización y acumulación de beta-catenina ha sido identificada como un evento clave para el desarrollo de una neoplasia.

La mayoría de las mutaciones de beta-catenina alteran los cuatro sitios diferentes de su fosforilación; además, también se han identificado otras mutaciones en genes que codifican para las moléculas reguladoras de beta-catenina. Por ejemplo, APC<sup>130</sup> está mutado en cáncer de colon, y también se han documentado mutaciones en axina.<sup>205</sup> El resultado o efecto común en ambas es la estabilización de beta-catenina y su subsecuente translocación al núcleo, donde beta-catenina causa activación transcripcional de los genes lo cual es un evento crucial en la oncogénesis. Interesantemente, se ha documentado la activación aberrante de esta vía como causa de ciertas neoplasias de la edad pediátrica.

## BETA CATENINA Y VÍA WNT

Más recientemente, se ha relacionado la vía Wnt con la organogénesis en animales vertebrados e invertebrados.<sup>91,114</sup> Ésta es una vía directamente relacionada con múltiples eventos celulares a nivel de la embriogénesis, regeneración y homeostasis celular, células madre y desarrollo del cáncer.<sup>140,167,181</sup> Algunos de los eventos en los que participa la vía Wnt

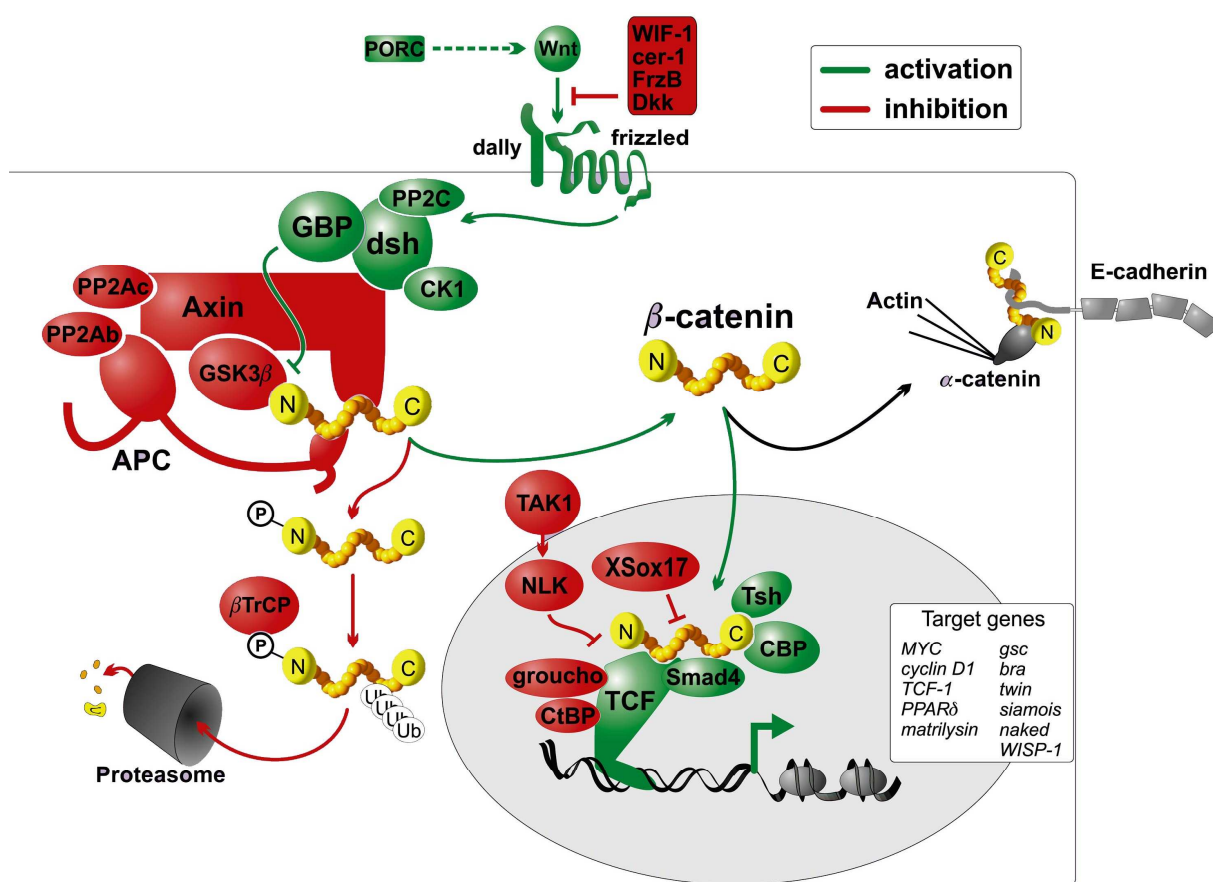


incluyen: proliferación, diferenciación y migración celulares, así como la interacción de las células epiteliales y mesenquimales con la matriz extracelular.<sup>159,162</sup> En etapas muy tempranas de la embriogénesis esta vía controla la formación del eje corporal, posteriormente es requerida para el desarrollo de muchos órganos, entre los cuales se encuentran el cerebro, la glándula mamaria, los dientes, los anejos cutáneos, el tracto reproductor y el riñón.<sup>22,46,161,250</sup> Además, se ha implicado a la vía Wnt en el desarrollo de algunas neoplasias, tanto de presentación pediátrica, como en adulto, entre ellas se encuentran: melanoma, adenocarcinoma de colon, carcinoma broncogénico, hepatoblastoma, pancreatoblastoma, meduloblastoma y también nefroblastoma. Una de las moléculas que desempeñan un rol sumamente importante en la vía Wnt es la molécula de adhesión beta-catenina. En reportes recientes, se han identificado mutaciones en beta-catenina hasta en el 15% de los casos, por lo que, de hecho, se cree que este proto-oncogén es más frecuente que el mismo WT1.

## VÍA WNT

La vía Wnt es una intrincada red de señales cuyas funciones se han mantenido a través de la evolución de las especies.<sup>77</sup> Su nombre es el resultado de la fusión de un gen de la *Drosophila* *Wingless* y el nombre de su homólogo vertebrado *integrated* o *int-1*.<sup>17</sup> Desde que el primer gen Wnt fue identificado en 1982,<sup>31</sup> sus mecanismos y funciones han sido ampliamente estudiados. Como ya se ha mencionado anteriormente, esta vía se asoció inicialmente con la embriogénesis<sup>258</sup> y su expresión está exquisitamente bien orquestada en espacio y tiempo, de manera que cualquier expresión anormal o desregulación de esta vía tiene efectos catastróficos en el desarrollo humano. Ahora se sabe que una vía Wnt defectuosa es causante de graves defectos congénitos en el humano, tales como defectos esqueléticos y del tubo neural (esпина bífida). De la misma manera, Wnt desempeña un papel importante en la carcinogénesis.<sup>86,97,109</sup> La vía Wnt está constituida por una serie de glicoproteínas relacionadas de tal forma que, una vez que se secreta una proteína de esta vía y se une a su receptor (frz), se produce una cascada de eventos que sólo pueden explicarse por los mismos miembros de este grupo de genes Wnt-frz.<sup>142,153</sup> La expresión de Wnt en la porción extracelular estimula numerosas señales de transducción a nivel intracelular a manera de cascadas.<sup>224</sup> La formación de estas cascadas depende de la combinación de genes Wnt-frz y de la desregulación de señales de receptores intracelulares (Fig. 6). De este modo, la vía Wnt se divide en una vía canónica o Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina, y una vía no canónica independiente de  $\beta$ -catenina.<sup>62</sup> Esta última, a su vez, se divide

en la vía de la polaridad celular planar -que regula la polaridad celular y los movimientos morfogénicos a través de la activación de la quinasa-aminoterminal c-jun (JNK)-, y en la vía Wnt- $\text{Ca}^{2+}$ <sup>138</sup> -la cual participa en la adhesión celular y la motilidad a través de la fosfolipasa C, proteinquinasa C y  $\text{Ca}^{2+}$ -calmomodulin-quinasa dependiente (PCP).<sup>215</sup> La vía canónica participa activamente en la proliferación y diferenciación celular a través de  $\beta$ -catenina/factor celular T (TCF),<sup>58</sup> promoviendo la activación transcripcional de sus genes blanco,<sup>233</sup> y es la vía que ha sido fuertemente implicada en el cáncer en humanos.



**Figura 6.** Representación esquemática de la vía de señalización Wnt.<sup>101</sup>

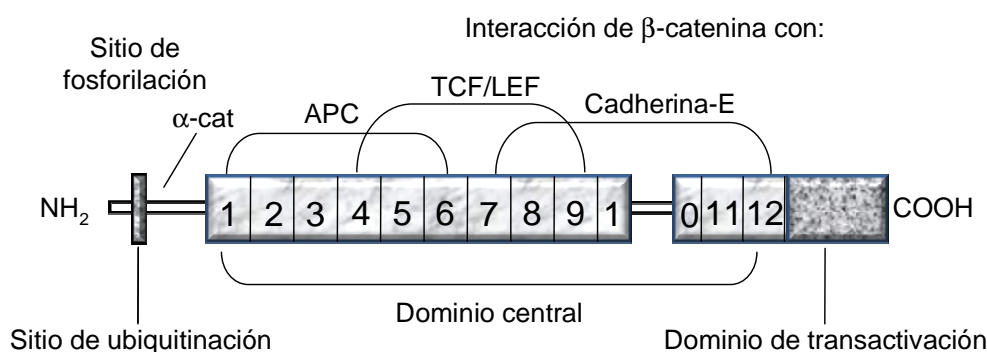
La vía Wnt involucra una compleja red de glicoproteínas (al menos 19 descritas hasta la fecha en el humano)<sup>113</sup> que regulan la interacción célula-célula y actúan como ligandos para estimular la transducción de señales mediadas por receptores.<sup>232</sup> La respuesta fisiológica y la intensidad con la que este estímulo molecular actúe a nivel celular, dependerán de los

diferentes ligandos Wnt, de la célula efectora y del tipo de organismo que sufran las señales moleculares. La homología proteica sugiere que Wnt ha estado presente a través de la evolución y en diferentes especies, ya que algunos aspectos de ésta vía son compartidos tanto por vertebrados, como por organismos invertebrados, como la esponja, e incluso por microorganismos como los hongos. En la vía Wnt canónica la molécula principal es la  $\beta$ -catenina,<sup>179</sup> el rol estructural que esta molécula realiza es importante no sólo en los procesos de adhesión celular basados en cadherinas,<sup>18,43,78</sup> sino también es esencial como co-activador de la expresión génica basada en la vía Wnt.<sup>13</sup> El grado en que  $\beta$ -catenina participa en estas dos funciones subyace en la habilidad de  $\beta$ -catenina para unirse a sus compañeros moleculares, éste último fenómeno es regulado mediante fosforilación. Una característica particular de los organismos multicelulares es la adhesión celular, esta característica otorga a las células tanto la facultad de adherirse entre ellas, como la de comunicarse molecularmente.<sup>83</sup> El sistema cadherina/catenina es el sistema principal por medio del cual las células se organizan y se mantienen comunicadas.<sup>121</sup> Sin este sistema de señales la morfogénesis no podría llevarse a cabo. Además de participar en la adhesión celular,  $\beta$ -catenina es requerido para mediar en las señales iniciadas por la vía Wnt, estas señales son críticas para la morfogénesis y son las que dictan o instruyen a las células en fases esenciales de la embriogénesis, tales como la gastrulación,<sup>225</sup> el cierre de la región dorsal,<sup>24</sup> y la migración neuronal.<sup>45</sup> El destino de cada célula está regulado por la expresión génica mediada por Wnt, la cual también depende del tipo celular,<sup>81</sup> es decir, y a modo de ejemplo, Wnt regula el mantenimiento de las células madre en el intestino, pero en el hígado, Wnt controla el metabolismo del nitrógeno y la desintoxicación de amonio a todo lo largo del tracto portal. Por tal motivo, queda claro que las respuestas celulares ante las señales de Wnt no sólo dependen de la expresión génica sino también del tipo celular específico que recibe las señales moleculares.<sup>42</sup> A su vez, la expresión de Wnt está regulada por un complejo transcripcional que contiene un sitio de unión para el ADN llamado lymphocyte enhancer factor (LEF)/T-cell factor (TCF) y una forma de  $\beta$ -catenina libre de cadherina. En este complejo,  $\beta$ -catenina funciona como coactivador obligado por su capacidad de reclutar otras moléculas que promueven la remodelación de la cromatina y el inicio de la transcripción.<sup>255</sup> La sobreexpresión de cadherinas puede competir por la señal de  $\beta$ -catenina,<sup>57</sup> por el contrario, niveles bajos de cadherina aumentan la expresión de señal de  $\beta$ -catenina.<sup>37</sup> Este fenómeno sugiere que el nivel absoluto de cadherinas es el umbral para la expresión de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina; sin embargo, otros estudios indican que el grado de fosforilación de los

compañeros moleculares de  $\beta$ -catenina rige la expresión de Wnt.<sup>226</sup>

## ESTRUCTURA GENÉTICA, EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y MUTACIONES DE BETA-CATENINA

Antes de su implicación en la vía Canónica Wnt,  $\beta$ -catenina fue identificada como compañera de cadherina-E en el sistema de adhesión celular dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>229</sup>  $\beta$ -catenina posee una función dual, está íntimamente relacionada con el sistema de adhesión celular<sup>94</sup> pero también participa activamente en actividades de transcripción en la vía Wnt.<sup>180</sup> Perteneciente a la familia de proteínas Armadillo y se caracteriza por poseer una región N-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos, una región central de 550 aminoácidos y una región C-terminal de 100 aminoácidos; la región N-terminal posee sitios de fosforilación para GSK, mientras que la región C-terminal posee la función transactivadora requerida para la activación de sus genes blanco.<sup>27,191</sup> La región central posee 12 secuencias imperfectas de repetición de 42 aminoácidos, conocidas como repetición Arm. La misma repetición Arm se observa en otras proteínas como  $\gamma$ -catenina y p120.<sup>9,178,243</sup> (Fig. 7)



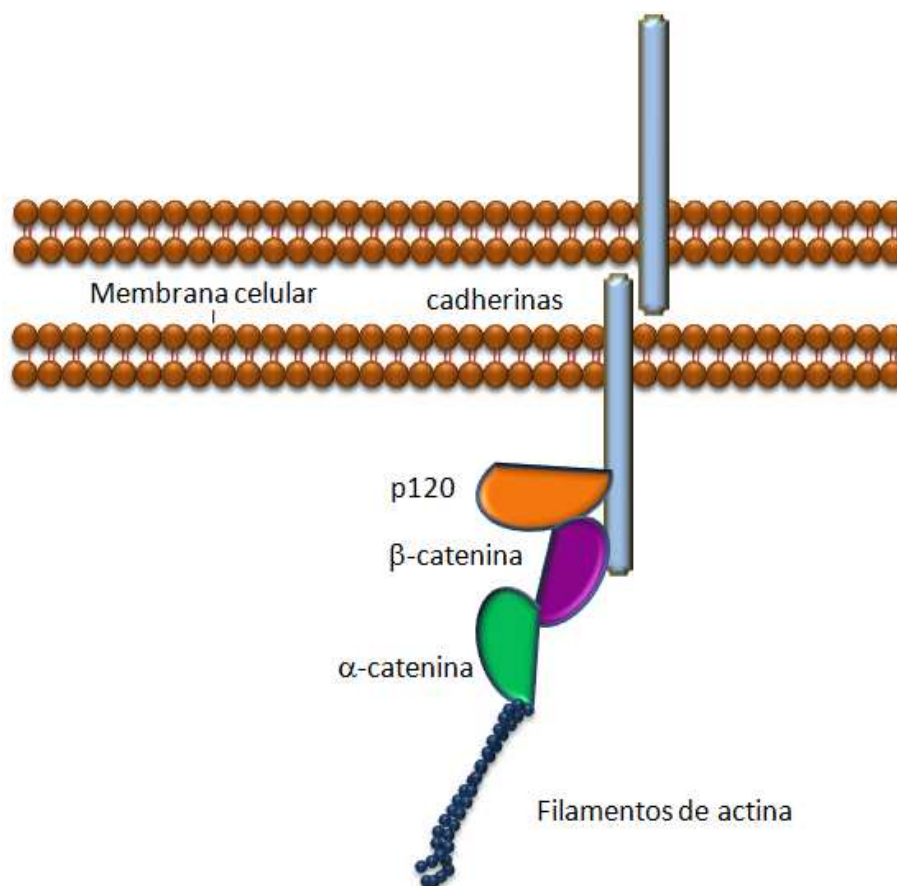
**Figura 7.** Estructura molecular de  $\beta$ -catenina.  $\beta$ -catenina participa en funciones de adhesión celular y en los procesos de transcripción a través de la vía Wnt. Una región central, compuesta por 12 repeticiones de 42 aminoácidos y conocida como repeticiones *arm*, le confiere la habilidad para realizar estas funciones. Además, la estructura de esta proteína le permite interactuar con cadherina-E y otras cateninas. El dominio N-terminal posee los sitios de fosforilación que le facilitan su degradación. Estos sitios de fosforilación son blanco de mutaciones que desregulan la proteína, lo que le confiere la cualidad de un proto-oncogén.

Las repeticiones Arm se describieron originalmente en el segmento del producto génico de la polaridad en *Drosophila* y en su ortólogo Armadillo (Arm).<sup>222</sup> Se observó que las mutaciones en Arm producían un fenotipo como el de *Wg* mutante, lo cual sugería que Arm podría ser parte de la vía *Wg*. Estudios posteriores mostraron que la inyección de ARNm de  $\beta$ -catenina en la porción ventral de embriones de *Xenopus* inducían el desarrollo de un segundo eje, este último fenómeno es una característica de la vía *Wg*.<sup>47,251</sup> Estos hallazgos revelaron que  $\beta$ -catenina, además de poseer funciones en la adhesión celular, también participaba iniciando la vía *Wnt/Wg*.<sup>88</sup> Mediante estudios cristalográficos con rayos X, el dominio central muestra que las 12 repeticiones Arm forman una súper hélice de hélices que crea una honda cargada positivamente.<sup>100</sup>  $\beta$ -Catenina utiliza esta característica para interactuar con diferentes moléculas, tales como el receptor de adhesión de cadherina, axina/APC y LEF/TCF,<sup>171</sup> los cuales se encuentran cargados negativamente. (Fig. 7).

### ***Beta-Catenina Como Parte del Complejo de Adhesión Cadherina/Catenina***

$\beta$ -catenina es el componente principal del complejo de adhesión cadherina/catenina.<sup>252</sup> Las cadherinas son glicoproteínas transmembrana de tipo I y son mediadores de la adhesión celular dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>21,177</sup> La cadherina se une a otra molécula idéntica situada en la superficie de una célula adyacente, el sitio específico de unión lo otorga el ectodominio de cadherina. Al mismo tiempo, el dominio citoplásmico de cadherina media tanto las actividades estructurales, como las señales necesarias para que la adhesión celular se lleve a cabo.<sup>103</sup> Además de su interacción con  $\beta$ -catenina, las cadherinas se unen a otros dos miembros de las cateninas,  $\alpha$ -catenina y p120.  $\alpha$ -catenina recluta y organiza los filamentos de actina del citoesqueleto<sup>51,192,263</sup> y dinámicamente los une con cadherina a través de  $\beta$ -catenina y p120.<sup>29,189</sup>  $\alpha$ -Catenina no posee la secuencia de repetición Arm y, por tanto, estructuralmente no está relacionada con  $\beta$ -catenina. Por su parte, p120 pertenece a la subfamilia de proteínas Armadillo y se encarga de regular los niveles de cadherina en la superficie celular al antagonizar su endocitosis<sup>44,262</sup> y promover el agrupamiento de cadherina,<sup>107,266</sup> probablemente gracias a su habilidad de inhibir Rho.<sup>253</sup> Aunque  $\alpha$ -catenina y p120 son importantes en el sistema de adhesión celular,<sup>214,220</sup>  $\beta$ -catenina sigue siendo esencial debido a que protege el dominio citoplásmico de cadherina inhibiendo su rápida degradación, aumentando la eficiencia del transporte a la superficie celular del retículo endoplásmico<sup>30</sup> y reclutando  $\alpha$ -catenina en los

sitios de contacto (Fig. 8).

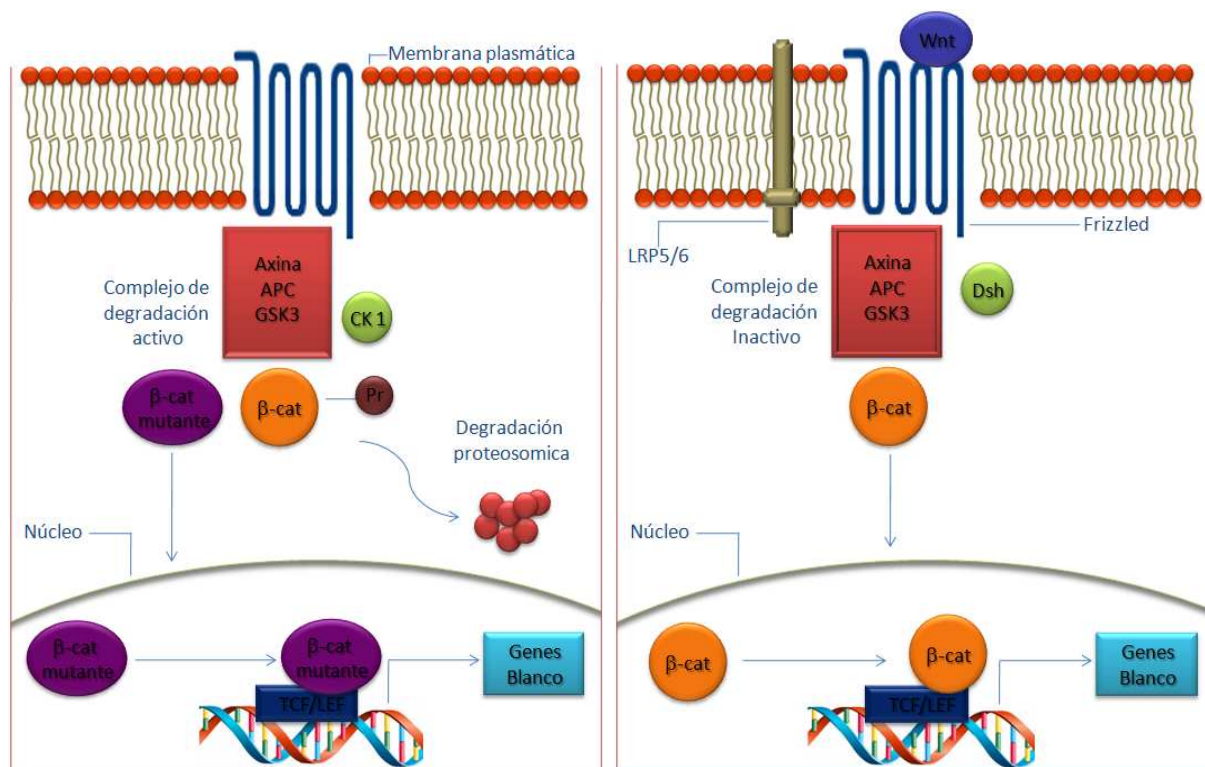


**Figura 8.** Función de  $\beta$ -catenina en la adhesión celular. Además de ser un elemento esencial en la vía Wnt,  $\beta$ -catenina participa activamente en el complejo de adhesión cadherina-catenina. El dominio citoplásmico de las cadherinas interactúa con p120 y se une a  $\alpha$ -catenina a través de  $\beta$ -catenina, este complejo se ancla al citoesqueleto de actina.

### ***Fosforregulación del Complejo de Degradación Beta-Catenina***

La regulación de los niveles de  $\beta$ -catenina se realiza mediante el complejo de degradación axina/APC por medio de una serie de eventos de fosforilación ordenados.<sup>133,137,197</sup> La fosforilación de axina por CK1 y GSK3 $\beta$  puede aumentar la unión de axina con  $\beta$ -catenina. Axina también promueve la fosforilación de APC por CK $\epsilon$  y GSK3 $\beta$ <sup>39</sup> lo que aumenta la afinidad de APC por  $\beta$ -catenina<sup>141,234</sup> (Fig. 9a). Por el contrario, las señales Wnt inhiben la acción del complejo de degradación de axina por medio de una proteína transmembrana llamada frizzled (FZ)<sup>211,257</sup> y un co-receptor, LRP5/6.<sup>217</sup> La unión con este co-receptor activa un relevo de señal, la proteína Dishevelled (Dsh),<sup>108,223</sup> y juntos FZ/LRP y Dsh antagonizan la

función degradadora de axina.<sup>137,147</sup> Este antagonismo lo realizan LRP -al romper el complejo de degradación de axina-, y DSh<sup>254</sup> -la cual inhibe la actividad de GSK3 $\beta$  (Fig. 9b).



**Figura 9a y b.** Función de  $\beta$ -catenina en la vía Wnt. **a)** Ante la ausencia de señales Wnt,  $\beta$ -catenina es eliminada mediante degradación proteosómica por el complejo de destrucción Axina-APC-GSK3. **b)** Cuando las proteínas Wnt son secretadas, su señal es mediada a través de las proteínas Frizzled, Dishevelled, LRP5 y LRP6, éstas inactivan el complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, impidiendo así su degradación. Mutaciones en  $\beta$ -catenina alteran los sitios de fosforilación de esta proteína, lo que evita su degradación. Ambas situaciones producen la acumulación intracitoplasmática y la translocación nuclear de  $\beta$ -catenina. Una vez en el núcleo,  $\beta$ -catenina interactúa con TCF/LEF, activando así la transcripción.

### ***Mutaciones en Beta-Catenina y Cáncer***

El componente principal de la vía Wnt,  $\beta$ -catenina, exhibe mutaciones en su región reguladora en una serie de cánceres de distintos orígenes.<sup>26,32,34</sup> En el cáncer de colon, se han reportado mutaciones de esta región hasta en un 50% de los casos.<sup>85,259,264</sup> En melanomas, las mutaciones encontradas afectan principalmente a la fosforilación de ser 37,<sup>48,172,186</sup> sitio de afección también reportado en carcinomas y adenomas hepatocelulares,<sup>106,236</sup> sin embargo, este

sitio rara vez se afecta en el cáncer de colon. Aún más, la expresión de  $\beta$ -catenina en melanoma parece asociarse con un peor pronóstico.<sup>116</sup> En el cáncer de próstata,<sup>239</sup> se han documentado cinco mutaciones en el sitio de regulación de  $\beta$ -catenina, cuatro de ellas afectan a la zona de fosforilación, y la otra se encuentra en un residuo de ser 33. La expresión ocurre focalmente, lo que indica que puede ser un fenómeno tardío en la progresión del cáncer prostático.<sup>72</sup> El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte por cáncer, los datos relacionados con Wnt y cáncer pulmonar<sup>160</sup> aún son limitados; sin embargo, en un estudio experimental en ratas, se han descrito mutaciones en  $\beta$ -catenina;<sup>237</sup> en otro estudio sobre carcinoma broncogénico de células pequeñas en el humano, aunque se observa expresión de  $\beta$ -catenina mediante inmunohistoquímica, no se han podido documentar mutaciones en este gen.<sup>95</sup> En el tracto genital femenino, los datos más relevantes indican que, al menos en el cáncer de ovario de origen epitelial, existen mutaciones de  $\beta$ -catenina en un 16% de los casos<sup>261</sup> y que éstas se presentan con mucha más frecuencia en los tumores con diferenciación endometriode,<sup>213</sup> esta observación también está documentada por Gamallo et al.<sup>67</sup> En tiroides, se han publicado mutaciones del exón 3 de  $\beta$ -catenina, pero éstas se circunscriben exclusivamente a los carcinomas pobremente diferenciados o indiferenciados.<sup>69</sup> En estómago, aunque se han descrito mutaciones similares, éstas son independientes del grado de diferenciación del tumor.<sup>33,63</sup> Las alteraciones genéticas de  $\beta$ -catenina no son exclusivas de los carcinomas, también existen datos sobre el papel de  $\beta$ -catenina en las neoplasias malignas de origen estromal;<sup>128,154,208</sup> en contraste, las mutaciones en el exón 3 se han descrito en un bajo porcentaje en liposarcomas e histiocitomas fibrosos malignos,<sup>203</sup> y ninguna mutación en osteosarcoma.<sup>92</sup>

## WNT Y TUMOR DE WILMS

Quizá de todas las neoplasias sólidas de la edad pediátrica la que mayor información puede aportar, desde el punto de vista molecular, es el tumor de Wilms; la razón radica en que el riñón, origen anatómico del tumor de Wilms, ha sido intensamente estudiado en relación con su ontogénesis y son, por ello, numerosos los procesos morfogenéticos que han sido descritos y caracterizados. Histológicamente, el tumor de Wilms exhibe tres componentes conocidos como blastema renal -una masa de células indiferenciadas de aspecto sincitial-, un componente epitelial que frecuentemente forma estructuras tubulares y glomeruloides, y el componente estromal que en ocasiones puede mostrar elementos heterólogos. Desde el punto de vista



morfológico, el tumor de Wilms recapitula fielmente los estadios iniciales del desarrollo renal; además, algunos casos de tumor de Wilms presentan focos de células blastemales, a manera de parches, inmersos en la corteza renal (restos nefrogénicos),<sup>244</sup> por lo que tanto las características histológicas como los restos nefrogénicos son evidencia de un origen pluripotencial.<sup>64,65,146</sup>

A nivel molecular, el tumor de Wilms expresa genes que han sido identificados como orquestadores del desarrollo renal.<sup>193</sup> Esta interrelación desarrollo renal/oncogénesis hace más interesante el estudio de este tumor. En particular, la vía Wnt tiene estrecha relación con el desarrollo renal y su componente más importante,  $\beta$ -catenina, ha sido objeto de intenso estudio en los últimos años.<sup>239</sup> El tumor de Wilms es genéticamente heterogéneo, se observan mutaciones en WT1 en el 10-15% de los casos esporádicos, mientras que la pérdida del fenómeno “imprinting” -o pérdida de heterozigocidad del gen IGF2- se observa aproximadamente en el 70% de los casos.<sup>209</sup> Cabe destacar que las mutaciones en  $\beta$ -catenina se observan en el 10%-15% de los tumores con mutaciones concomitantes de WT1, por lo que juntas, mutaciones en WT1 y  $\beta$ -catenina, conforman el 10% de los casos.<sup>122,126</sup> Así mismo, se han observado mutaciones en p53 en el 5% de los casos, y sólo se expresan en los tumores de histología desfavorable focal o difusa. Después de WT1/WT2,  $\beta$ -catenina es el gen más importante relacionado con el tumor de Wilms;<sup>123</sup> aunque la cantidad de estudios que involucran a  $\beta$ -catenina en el desarrollo del tumor de Wilms no es grande, los datos arrojados sí son importantes. En una serie de estudios diferentes se han documentado mutaciones en el gen  $\beta$ -catenina. La mayoría de las mutaciones en  $\beta$ -catenina afectan a un sitio de fosforilación (serina/treonina 45) lo cual identifica al codón 45 como una mutación puntual de los tumores de Wilms;<sup>129</sup> las alteraciones descritas comprenden desde pequeños cambios de nucleótidos hasta pequeñas deleciones intersticiales,<sup>193</sup> y el resultado es la pérdida de serina 45, uno de los cuatro sitios de fosforilación de beta-catenina codificados por el exón 3 de  $\beta$ -catenina.<sup>144,184</sup> Como se mencionó previamente, un estudio reveló mutaciones concomitantes de beta-catenina y WT1 lo que sugiere un probable sinergismo para el desarrollo del tumor de Wilms.<sup>136</sup> En estudios posteriores se encontró que las mutaciones de  $\beta$ -catenina pueden estar presentes invariablemente en presencia o ausencia de mutaciones en WT1.<sup>199</sup> Estas observaciones hacen pensar que en aquellos tumores que presentan mutación en WT1, pero no en  $\beta$ -catenina, pudieran existir lesiones genéticas en otros miembros de la vía Wnt o incluso en otros genes

aún no revelados. Un ejemplo de esto es APC pues se han detectado mutaciones en él que incluyen pérdida de heterozigocidad en 5q21, el loci de APC.<sup>72,119,157</sup> Un estudio más reciente refuerza esta idea, Ruteshouser et al. encontraron que las mutaciones en WT1, WTX y CTNNB1 sólo explicaban alrededor del 33% de los tumores de Wilms esporádicos.<sup>199</sup>

Por último, aunque los hallazgos en la biología del tumor de Wilms poco a poco van revelando su etiología molecular, los genes diana a través de los cuales actúa Wnt en el tumor de Wilms están a la espera de ser descubiertos; sin embargo, observaciones recientes indican que, además de la desregulación de  $\beta$ -catenina, otros genes blanco directos de la vía Wnt están involucrados en el desarrollo del tumor de Wilms, éste es el caso de PITX2, APCDD1 y dos miembros de la vía de la endotelina (EDN3 y EDNRA).<sup>270</sup> Adicionalmente, también se activan moléculas inhibitoras de Wnt, como WIF1 y PRDC,<sup>219</sup> y su función puede estar relacionada con un mecanismo de retroalimentación negativa. Al parecer estos genes interactúan además con otras vías como la del ácido retinoico y la vía ras.<sup>65,270</sup>

En definitiva, el nefroblastoma es el tumor maligno más frecuente del tracto urinario durante la infancia, y uno de los tumores malignos intraabdominales más habituales. Desde el punto de vista histogenético y morfológico, el nefroblastoma es un tumor complejo, que está formado por blastema metanéfrico y elementos epiteliales y mesenquimales en diferentes proporciones. Los importantes avances realizados en los últimos años en el conocimiento de la biología del nefroblastoma han permitido identificar moléculas relacionadas con la carcinogénesis y la progresión de este tumor, entre las que el gen *WT1* tiene un papel fundamental, aunque hay otros genes y vías de señalización implicadas en el desarrollo de este tumor. Entre los genes regulados por *WT1* está *CDH1*, que codifica la proteína cadherina E, que forma parte del denominado complejo cadherina-catenina y está implicada en las interacciones epitelio-epitelio y en la transición epitelio-mesénquima.

Por todo ello, en la presente Tesis se pretende estudiar la expresión diferencial de las moléculas del complejo cadherina (cadherina E y cadherina P)-catenina ( $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina y p120) en los distintos componentes blastemal, epitelial y estromal del nefroblastoma; así como su significado biológico y diagnóstico en los diferentes tipos de nefroblastoma.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS

**PRIMERA.** Las diferentes moléculas del complejo cadherina (cadherina E y cadherina P)-catenina ( $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina y p120) se expresan diferencialmente en los distintos componentes blastemal, epitelial y estromal del nefroblastoma; y además, esta expresión diferencial puede tener importancia en el diagnóstico de los diferentes tipos de nefroblastoma.

## OBJETIVOS

**PRIMERO.** Describir los diferentes patrones de expresión de las moléculas de adhesión del complejo cadherina-catenina en el nefroblastoma.

**SEGUNDO.** Comparar la intensidad del inmunomarcaje de las moléculas de adhesión del complejo cadherina-catenina en los diferentes componentes blastemal metanéfrico, epitelial y estromal del nefroblastoma.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## MATERIAL

En el presente estudio, se han evaluado inmunohistoquímicamente un grupo de moléculas relacionadas con la adhesión celular pertenecientes al complejo Cadherina-catenina, así como el índice de proliferación celular en tejido representativo de tumores renales con diagnóstico anatomopatológico de tumor de Wilms. Los tejidos utilizados para este fin procedían de los archivos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre de Madrid, España. El material recolectado para el estudio consistió en 45 casos de neoplasias malignas renales de la edad pediátrica, previamente preservados en formalina e incluidos en parafina. Se realizaron nuevas secciones histológicas del material recolectado y fueron evaluadas por tres patólogos (Dr. José Luis Rodríguez Peralto, Dr. David Hardisson Hernáez y Dr. Marco Antonio Ponce Camacho) para confirmar el diagnóstico de tumor de Wilms y seleccionar el tejido más adecuado para ser sometido a estudio. Se seleccionaron un total de 45 casos cuyo criterio de selección fue el siguiente:

- ❖ Todos los casos tenían que corresponder a tumor de Wilms trifásico, es decir, todos y cada uno de ellos presentaban los tres componentes descritos en el tumor de Wilms clásico (epitelial, blastemal y estromal) en proporciones diferentes.
- ❖ Todos los bloques de parafina seleccionados tenían que carecer de necrosis o cambios secundarios a tratamiento quimio o radioterapéutico.
- ❖ Los casos tenían que escogerse de forma aleatoria.
- ❖ Al menos un fragmento de tejido renal normal de cada caso fue seleccionado como control.

## MÉTODOS

### *Métodos de Estudio Histológico General*

- **Fijación de las Piezas Quirúrgicas**

Los especímenes quirúrgicos corresponden a nefrectomías radicales que se fijaron por inmersión en formaldehído tamponado al 4%, durante un período de 24 a 72 horas.

- **Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas**

Los especímenes quirúrgicos fueron sometidos a secciones seriadas paralelas con un espesor de entre 0,5 a 0,7 cm para su examen macroscópico; así mismo, para el estudio microscópico, se tomaron secciones representativas del tumor con un espesor de aproximadamente 0,3 cm y se colocaron en bio-cassettes para su procesamiento. El tejido se procesó para técnica en parafina usando un procesador de tejidos de la marca Autotechnicon Duo®, este instrumento realiza el procesamiento del tejido de manera secuencial, deshidrata los tejidos utilizando alcohol en concentraciones crecientes al 70%, 96% y 100%, exponiendo los tejidos durante una hora en cada una de estas concentraciones. Posteriormente, el tejido es aclarado utilizando acetato de butilo, dando dos pases de una hora cada uno. A continuación, los tejidos se embeben en parafina líquida (punto de fusión 60° C) durante un periodo de 2 horas y, finalmente, se incluyen en bloques para ser seccionados.

De los bloques en parafina, se obtuvieron secciones seriadas de 5 µm de espesor utilizando un micrótopo de la marca Ernst Leitz GMBH (Typ 1212) Wetzlar Germany®, cada sección se colocó en un baño de flotación y se montó en cristales. Posteriormente, las secciones fueron desparafinadas en Xyleno e hidratadas en alcoholes de concentraciones decrecientes. A continuación, las secciones fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E), aclaradas con agua destilada, y colocadas en un portaobjetos; se utilizó como medio de montaje resina sintética DePex (Probus, Badalona).

### ***Método Inmunohistoquímico de la Expresión Proteica***

En este estudio, para determinar la expresión e inmunolocalización de las moléculas evaluadas en el tumor de Wilms, se han utilizado siete anticuerpos; como método inmunohistoquímico se utilizó la técnica de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (EBP). Este método nos permitió, en primer lugar, evaluar tanto la inmunoexpresión de las moléculas de adhesión utilizadas, como el índice de proliferación celular en los diferentes componentes del tumor de Wilms, y, en segundo lugar, identificar su inmunolocalización. La evaluación fue realizada mediante la observación directa con un microscopio óptico convencional; en cada caso, se evaluó la positividad en los diferentes componentes celulares neoplásicos, y se observó su localización para cada uno de los anticuerpos utilizados contra moléculas de adhesión celular. El anticuerpo Ki67 también se evaluó de la misma manera, pero además, en este caso,

se determinó el porcentaje de positividad nuclear en las células neoplásicas. Un índice de proliferación bajo fue aquel en el cual menos del 20% de las células resultaron positivas para este marcador, y se consideró un índice de proliferación celular alto cuando la positividad de este marcador fue superior al 20% de las células neoplásicas evaluadas.

En la tabla 1 se incluyen los anticuerpos, el clon de cada anticuerpo, la dilución utilizada -previamente estandarizada en el laboratorio-, y la casa comercial que suministró los diferentes anticuerpos utilizados. Se tomó como control el tejido renal no neoplásico correspondiente a cada caso.

**Tabla 1.** Anticuerpos y diluciones utilizadas en el inmunomarcaje.

Anticuerpo	Clon	Casa	Dilución
Cadherina E	NCH-38	DAKO	Prediluido
Cadherina P	56	BD Transduction	1:100
p120	98	BD Transduction	1:200
alfa-Catenina	A-Catenin	DAKO	1:100
beta-Catenina	14	BD Transduction	1:1000
gamma-Catenina	15	BD Transduction	1:1000
ki67	MIB-1	DAKO	1:150

#### • Método Inmunohistoquímico de Envision

La técnica de inmunohistoquímica se realizó utilizando un inmunoteñidor automático Autostainer plus (Dako). La expresión de la proteína se detectó con el método de visualización Envision Flex (Dako) utilizando anticuerpos, mono o policlonales, contra el grupo de proteínas que fueron estudiadas (ver Tabla 1). Se obtuvieron siete secciones histológicas de cada caso, las cuales fueron desparafinadas e hidratadas con una serie de alcoholes decrecientes hasta el agua destilada; a continuación, se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua destilada y se realizó la recuperación antigénica con EDTA a 150°C durante 45 minutos utilizando el sistema PT Link (DAKO). Enseguida, los cristales fueron lavados de nuevo con agua destilada y a continuación en tampón Tris pH=7,4 a temperatura ambiente. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario. Las muestras se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se añadió el anticuerpo secundario



conjugado. Finalmente, las preparaciones se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se revelaron mediante la aplicación del cromógeno diaminobencidina, por un período de 5 minutos. Se realizó contratinción con hematoxilina de Harris.

### ***Métodos de Interpretación de la Inmunoexpresión e Inmunolocalización***

La interpretación de las preparaciones histológicas procesadas mediante inmunohistoquímica se realizó bajo visión directa con ayuda de un microscopio óptico marca Olympus®. La totalidad de las preparaciones fueron interpretadas identificando la positividad de las células tumorales mediante un método cualitativo, es decir, se identificó primero que las células neoplásicas fueron positivas para los diferentes marcadores analizados en cualquiera de los patrones histológicos del tumor de Wilms; se tomó como positivo cuando cualquier patrón mostró positividad en más del 1% de las células tumorales. Debido a que todos los tumores mostraron los tres patrones de crecimiento en diferentes proporciones, esta expresión fenotípica aleatoria, junto con la inmunoexpresión de las proteínas estudiadas, se analizó de manera randomizada. Cada caso fue interpretado contrastándolo con controles, los cuales correspondieron a tejido renal no neoplásico, con el fin de corroborar la correcta realización de la técnica de inmunohistoquímica.

- **Valoración Cualitativa de  $\alpha$ -Catenina,  $\beta$ -Catenina, p120,  $\gamma$ -Catenina, Cadherina-E y Cadherina-P**

El proceso de interpretación para cada uno de estos anticuerpos se realizó revisando bajo microscopio la totalidad de la laminilla, y esto se hizo en dos fases; en la primera, se identificó como positivo cuando el anticuerpo mostró inmunorreacción en al menos el 1% de las células neoplásicas evaluadas, y se interpretó como negativo cuando las células neoplásicas mostraron nula positividad o alguno de los patrones histológicos mostró inmunorreacción en menos del 1% de las células. En la segunda fase, se identificó la inmunolocalización del anticuerpo, o localización subcelular, ya fuera ésta en la membrana, el citoplasma o el núcleo. Los hallazgos fueron entonces anotados en una tabla Excel para su posterior análisis estadístico. Las laminillas que mostraron nula reacción o tinción de fondo fueron descartadas y se realizó de nuevo el anticuerpo que resultó con defectos de la técnica.

- **Valoración Semicuantitativa de Ki67**

La valoración del índice de proliferación celular fue realizada con un método semicuantitativo, y, de nuevo, debido a las características fenotípicas del tumor de Wilms, este marcador fue analizado aleatoriamente al interpretar la positividad de Ki67 de manera individual en cada uno de los diferentes patrones de crecimiento. Se seleccionaron campos al azar y se contaron 100 células en cada uno de los tres patrones de crecimiento; se interpretó como alto índice de proliferación celular cuando la positividad nuclear fue mayor del 20%. El índice de proliferación se interpretó como bajo cuando menos del 20% de las células mostraron positividad nuclear para Ki67. Los hallazgos fueron documentados en una tabla Excel de manera individual.

### ***Métodos Estadísticos***

- **Manejo de Datos**

Para informatizar los datos, se creó una base de datos (BD) con el programa Microsoft Access y se procesaron con la estructura adecuada para poder analizarlos posteriormente y llegar a conclusiones basadas en los objetivos del estudio.

Para una mayor fiabilidad de los datos creamos una estructura de control de calidad en dos fases:

1.- “A priori”, diseñando en Access los filtros, máscaras y reglas de validación oportunos en cada una de las variables a tabular.

2.- “A posteriori”, creando un programa de frecuencias y máximos y mínimos que detecte valores fuera de los rangos “normales”, o posibles “outliers”, comprobando posteriormente los valores.

De esta manera se consigue minimizar los errores producidos en la tabulación de los datos.

Para el análisis estadístico se transforma la BD de Access en una BD con formato del paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) en su versión 17.0, mediante ODBC suministrado por el propio programa. El estudio estadístico consta de dos fases: estadística descriptiva y estadística univariante.

- **Estadística Descriptiva**

En general, para las variables de estudio de tipo cualitativo, empleamos como resumen la frecuencia absoluta (n) y la relativa en forma de porcentaje (%).

- **Estadística Univariante**

En todos los análisis se establece un nivel de significación en valores por debajo de 0,05, lo que es lo mismo que decir que se establece un nivel de confianza del 95%.

Para estudiar la asociación entre los distintos patrones con la intensidad del inmunomarcaje, variables cualitativas -es decir, la intensidad de inmuoexpresión de los marcadores inmuistoquímicos de la familia de las cadherinas (cadherina E y cadherina P), de la proteína P 120, y de la familia de las cateninas (alfa, beta y gamma catenina)- utilizamos el test de chi-cuadrado de Pearson cuando el tamaño de la muestra es suficientemente grande; para los casos con muestras pequeñas (20% o más celdas con valores de frecuencia esperada inferiores a 5), se emplea el test exacto de Fisher para comparar dos complejos; o el test de chi-cuadrado corregido de Yates (corrección por continuidad) cuando se estudian las diferencias en más de dos complejos.

Para estudiar la asociación entre los distintos patrones con la intensidad del inmunomarcaje, así como en las distintas expresiones, utilizamos el test de chi-cuadrado de Pearson como norma general cuando el tamaño de la muestra es suficientemente grande, para los casos con muestras pequeñas (20% o más celdas con valores de frecuencia esperada inferiores a 5), se emplea el test exacto de Fisher o chi-cuadrado corregido de Yates (corrección por continuidad) cuando se estudia las diferencias en más de dos categorías.

Los gráficos utilizados pretenden resumir los mismos estimadores estadísticos, destacando los más relevantes.

### ***Técnicas fotográficas***

Las imágenes fueron seleccionadas de manera que fueran representativas de los hallazgos encontrados y fueron capturadas con un microscopio de la marca Olympus BX51 acoplado a una cámara digital marca Olympus DP70. Todas las imágenes fueron almacenadas en formato

TIF y procesadas con el programa Adobe Photoshop 7.0. La composición de las planchas iconográficas se realizó con el programa Quark X Press 6.0.

## **RESULTADOS**

### ***Evaluación Semicuantitativa de la Intensidad de Inmunomarcaje de las Moléculas del Complejo Cadherina-Catenina en los Diferentes Patrones Histológicos de Nefroblastoma***

En este estudio y mediante la técnica de inmunohistoquímica hemos evaluado la expresión de un grupo de moléculas de adhesión pertenecientes al grupo de la cadherina-catenina en un tumor renal pediátrico. Cada molécula ha sido interpretada de manera individual en los diferentes sub-compartimentos histológicos de este tumor primitivo. Se han examinado un total de 45 casos; cada uno de estos consistió en componentes maduros epiteliales representados por estructuras tubulares simples algunas con aspecto maduro, otras con pequeños túbulos simples primitivos y de apariencia inmadura, también pudieron observarse estructuras papilares arborescentes complejas (Fig. 33). Los elementos blastemales evaluados casi siempre mostraron islotes u hojas sólidas de células sincitiales y con apariencia primitiva (Fig. 33). Además, la parte estromal exhibió células elongadas o fusiformes con fenotipo estromal y rabiomioblástico (Fig. 34). Cuarenta y cuatro casos correspondieron a nefroblastoma de histología favorable y solo un caso mostró cambios histológicos de histología desfavorable. Aunque todos los casos de nefroblastoma fueron de tipo trifásico, todos mostraron un patrón histológico predominante, así el patrón blastemal predominó en 24 casos, el epitelial en 14 y el patrón estromal en 7 casos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Frecuencia y porcentaje de los distintos tipos histológicos del nefroblastoma.

Patrón Histológico		
Tipo	Frecuencia	Porcentaje
<b>Epitelial</b>	14	31,1
<b>Blastemal</b>	24	53,3
<b>Estromal</b>	7	15,6

#### **• Evaluación Morfológica de la Expresión de Cadherina-E en el Nefroblastoma**

Como era de esperar, los túbulos no neoplásicos mostraron positividad para el epítoto cadherina-E. En el nefroblastoma, cadherina-E presentó intensa positividad en las membranas

celulares de los epitelios independientemente de si estos eran de apariencia madura o inmadura (Fig.44) (Tabla 3). El componente blastemal también mostró frecuente positividad para este epítotope en la región membranosa (Tabla 4). Solo 1 caso fue positivo en la porción intracitoplásmica (Tabla 3) mostrando potente positividad en forma de gruesos gránulos. Sorprendentemente, un caso mostró desregulación de la proteína cadherina-E al ser identificado en el núcleo de las células tumorales del nefroblastoma (Figs. 10,45).

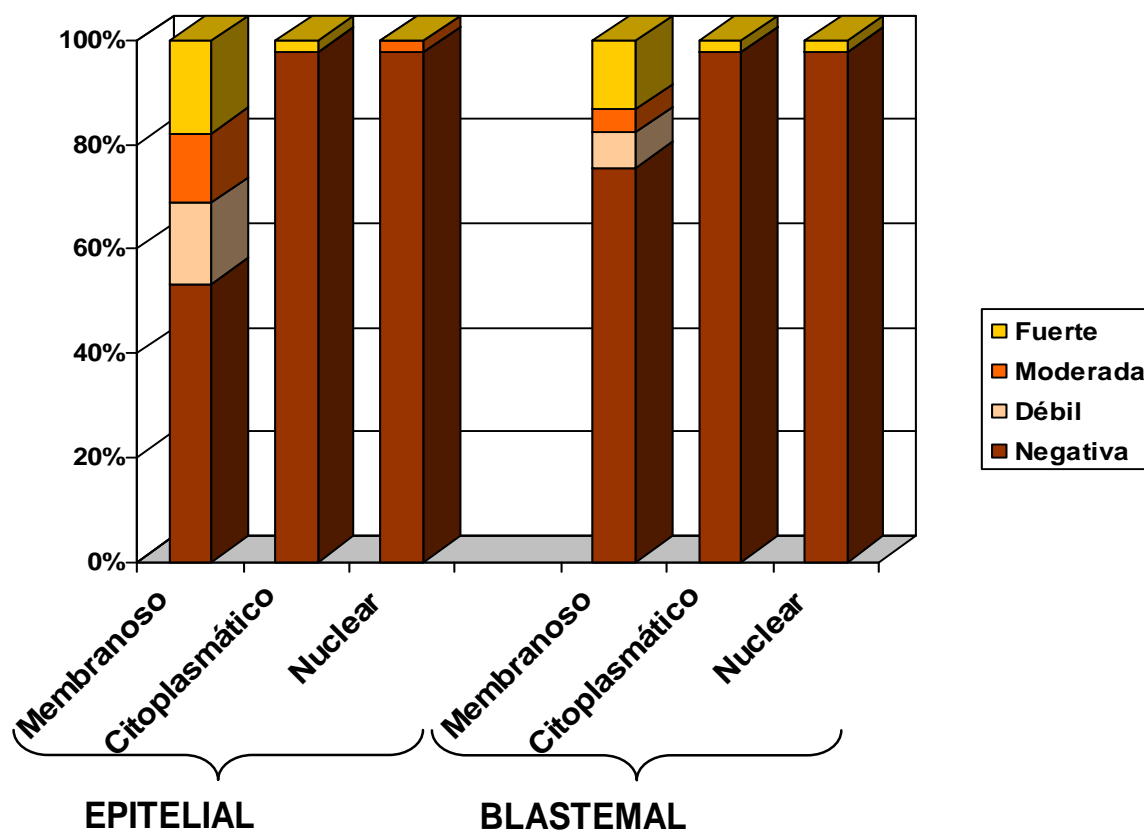
**Tabla 3.** Intensidad del inmunomarcaje de *Cadherina E* en el patrón epitelial del nefroblastoma (n=45).

Patrón Epitelial			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
<b>Negativa</b>	24 (53,3)	44 (97,8)	44 (97,8)
<b>Débil</b>	7 (15,6)	0	0
<b>Moderada</b>	6 (13,3)	0	1 (2,2)
<b>Fuerte</b>	8 (17,8)	1 (2,2)	0

**Tabla 4.** Intensidad del inmunomarcaje de *Cadherina E* en el patrón blastemal del nefroblastoma (n=45).

Patrón Blastemal			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
<b>Negativa</b>	34 (75,6)	44 (97,8)	44 (97,8)
<b>Débil</b>	3 (6,7)	0	0
<b>Moderada</b>	2 (4,4)	0	0
<b>Fuerte</b>	6 (13,3)	1 (2,2)	1 (2,2)

No se ha detectado inmunoexpresión de caherina E en el patrón estromal del nefroblastoma.



**Figura 10.** Intensidad del inmunomarcaje de cadherina-E en los diferentes patrones del nefroblastoma.

- **Evaluación Morfológica de la Expresión de Cadherina-P en el Nefroblastoma**

La cadherina-P exhibió pobre reactividad en los casos estudiados, este epítoto presentó potente positividad, principalmente en la región sub-apical del citoplasma de las células epiteliales de apariencia más madura (Fig. 46); mientras que en los túbulos simples e inmaduros, este epítoto se mostró con leve intensidad finamente granular en el citoplasma (Fig. 47). La reactividad de cadherina-P en todas las regiones subcelulares fue escasa (Tablas 5-7) al igual que la reactividad nuclear (Fig. 11).



**Tabla 5.** Intensidad del inmunomarcaje de *Cadherina P* en el patrón epitelial del nefroblastoma (n=45).

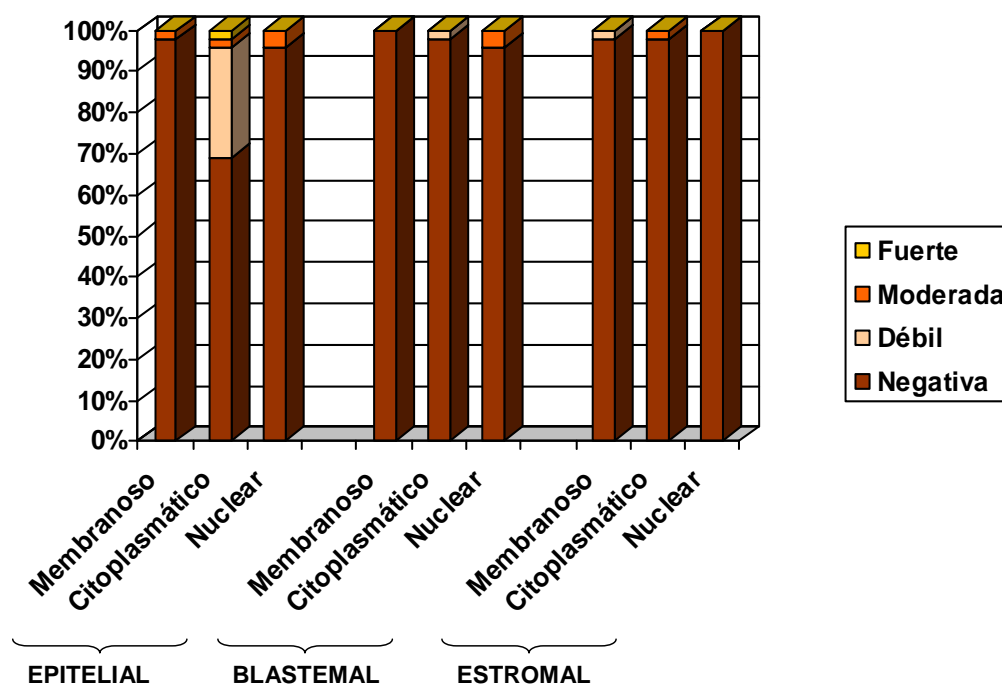
Patrón Epitelial			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
<b>Negativa</b>	44 (97,8)	31 (68,9)	43 (95,6)
<b>Débil</b>	0	12 (26,7)	0
<b>Moderada</b>	1 (2,2)	1 (2,2)	2 (4,4)
<b>Fuerte</b>	0	1 (2,2)	0

**Tabla 6.** Intensidad del inmunomarcaje de *Cadherina P* en el patrón blastemal del nefroblastoma (n=45).

Patrón Blastemal			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
<b>Negativa</b>	45 (100)	44 (97,8)	43 (95,6)
<b>Débil</b>	0	1 (2,2)	0
<b>Moderada</b>	0	0	2 (4,4)
<b>Fuerte</b>	0	0	0

**Tabla 7.** Intensidad del inmunomarcaje de *Cadherina P* en el patrón estromal del nefroblastoma (n=45).

Patrón Estromal			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
<b>Negativa</b>	44 (97,8)	44 (97,8)	45 (100)
<b>Débil</b>	1 (2,2)	0	0
<b>Moderada</b>	0	1 (2,2)	0
<b>Fuerte</b>	0	0	0



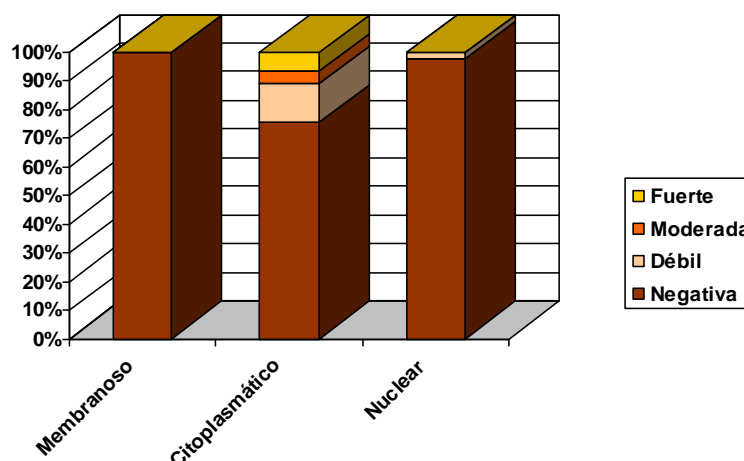
**Figura 11.** Intensidad del inmunomarcaje de cadherina-P en los diferentes patrones del nefroblastoma.

#### • Evaluación Morfológica de la Expresión de Alfa-Catenina en el Nefroblastoma

La expresión de  $\alpha$ -catenina mostró positividad en 13 de 45 casos; Los casos que resultaron positivos para este epítipo se expresaron en la región citoplasmática de los elementos epiteliales mostrando toscos grumos difusamente distribuidos en todo el citoplasma; este epítipo se expresó de forma similar en las células blastemales (Figura 35). Once casos mostraron positividad en el compartimento sub-celular intracitoplasmático (Tabla 8) (Fig.12).

**Tabla 8.** Intensidad del inmunomarcaje de  $\alpha$ -Catenina en el patrón epitelial del nefroblastoma (n=45).

Patrón Epitelial			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
Negativa	45 (100)	34 (75,6)	44 (97,8)
Débil	0	6 (13,3)	1 (2,2)
Moderada	0	2 (4,4)	0
Fuerte	0	3 (6,7)	0



**Figura 12.** Intensidad del inmunomarcaje de  $\alpha$ -catenina en el patrón epitelial del nefroblastoma.

La inmunoexpresión de  $\alpha$ -catenina fue negativa en las regiones membranosa y nuclear del patrón blastemal; sin embargo, en el citoplasma se encontraron 37 casos negativos para  $\alpha$ -catenina (82,2%), 3 casos (6,7%) con una intensidad de inmunomarcaje débil, 2 casos (4,4%) con intensidad moderada y 3 casos (6,7%) con intensidad fuerte. Así mismo, la inmunoexpresión de  $\alpha$ -catenina en los compartimentos histológicos membranoso y nuclear del patrón estromal del nefroblastoma también fue negativa; no obstante, en el patrón estromal citoplásmico, se detectaron 44 casos (97,8%) negativos para  $\alpha$ -catenina, y solo 1 caso (2,2%) con expresión fuerte.

#### • Evaluación Morfológica de la Expresión de Beta-Catenina en el Nefroblastoma

En el riñón no neoplásico,  $\beta$ -catenina se expresó, casi exclusivamente, en la región basolateral de la membrana celular del epitelio tubular renal cortical y medular, con potente intensidad y delineando perfectamente esta región. No se detectó expresión intracitoplasmática y nuclear del epitelio tubular renal. La zona túbulo intersticial, los vasos sanguíneos y los glomérulos no mostraron reactividad para el epítotope  $\beta$ -catenina. En el tejido neoplásico, la expresión de  $\beta$ -catenina resultó ser muy diversa, 11 de los 45 casos mostraron nula reactividad para este epítotope. La proteína se expresó principalmente en la región subcelular membranosa e intracitoplásmica de los epitelios maduros (Fig. 37), predominantemente en la porción basal y lateral pero también en la región apical (Fig 38).

$\beta$ -catenina también pudo ser observada en las células blastemales; en esos elementos del nefroblastoma,  $\beta$ -catenina resultó positiva en la membrana pero también dentro del citoplasma

(figura 38). La positividad en ambos casos (elementos epiteliales y blastematosos) resultó ser de potente intensidad lineal cuando se trató de las membranas celulares, y de gruesos grumos cuando se trató de la región intracitoplasmática (Tablas 9,10). Las células estromales también mostraron positividad en la membrana celular pero solamente en dos de los 45 casos estudiados. Sin duda, la expresión más interesante fue la encontrada en el núcleo. La inmunolocalización nuclear pudo ser observada en 10 de los 45 casos evaluados (Tablas 9-11). Los tres sub-compartimentos histológicos mostraron positividad nuclear, se encontraron 5 casos positivos en los elementos blastemales, 3 en los epiteliales y, finalmente, 2 en la parte estromal de los nefroblastomas, estos últimos elementos se mostraron como heterólogos con diferenciación rhabdomioblástica (Figs. 13,34,39), todos los casos mostraron positividad nuclear intensa.

**Tabla 9.** Intensidad del inmunomarcaje de  *$\beta$ -Catenina* en el patrón epitelial del nefroblastoma (n=45).

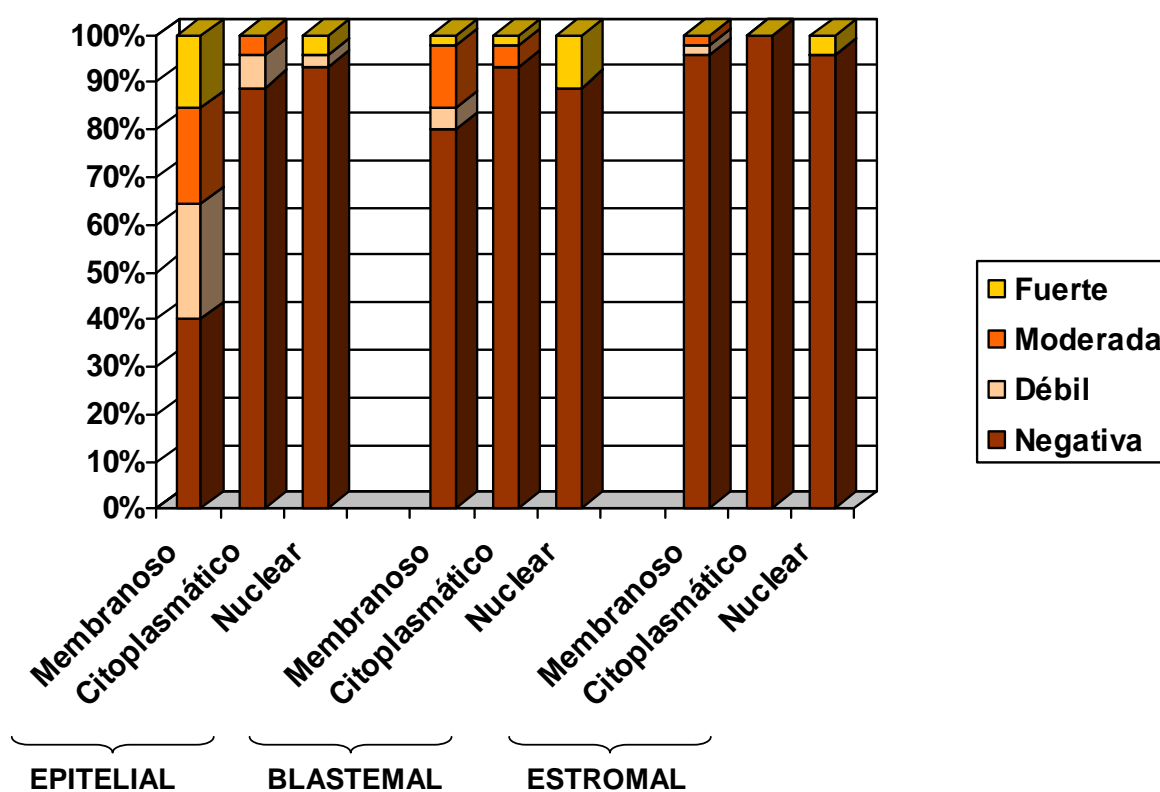
Patrón Epitelial			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
Negativa	18 (40,0)	40 (88,9)	42 (93,3)
Débil	11 (24,4)	3 (6,7)	1 (2,2)
Moderada	9 (20,0)	2 (4,4)	0
Fuerte	7 (15,6)	0	2 (4,4)

**Tabla 10.** Intensidad del inmunomarcaje de  *$\beta$ -Catenina* en el patrón blastemal del nefroblastoma (n=45).

Patrón Blastemal			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
Negativa	36 (80,0)	42 (93,3)	40 (88,9)
Débil	2 (4,4)	0	0
Moderada	6 (13,3)	2 (4,4)	0
Fuerte	1 (2,2)	1 (2,2)	5 (11,1)

**Tabla 11.** Intensidad del inmunomarcaje de  $\beta$ -Catenina en el patrón estromal del nefroblastoma (n=45).

Patrón Estromal			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
Negativa	43 (95,6)	45 (100)	43 (95,6)
Débil	1 (2,2)	0	0
Moderada	1 (2,2)	0	0
Fuerte	0	0	2 (4,4)



**Figura 13.** Intensidad del inmunomarcaje de  $\beta$ -catenina en los diferentes patrones del nefroblastoma.

• **Evaluación Morfológica de la Expresión de Gamma-Catenina en el Nefroblastoma**

La expresión de  $\gamma$ -catenina resultó muy similar a la de  $\alpha$ -catenina. En el riñón no tumoral,  $\gamma$ -catenina mostró toscos grumos en el citoplasma de las células del epitelio tubular renal, pero no mostró reactividad ni en los glomérulos ni en el intersticio. Con mucho, los elementos epiteliales y blastematosos fueron más frecuentemente positivos, especialmente en el citoplasma  $\gamma$ -catenina mostró moderada positividad en la membrana celular y potente intensidad con grumos gruesos en el citoplasma (Fig.42). Los islotes blastemales exhibieron grumos finos en el citoplasma (Fig. 43). El número de casos positivos observados en la región citoplasmática fue de 25 y 14 en los elementos epiteliales y blastematosos, respectivamente (Tablas 12 y 13) (Fig.14). En dos casos se observó expresión nuclear en los islotes blastematosos (Fig. 43).

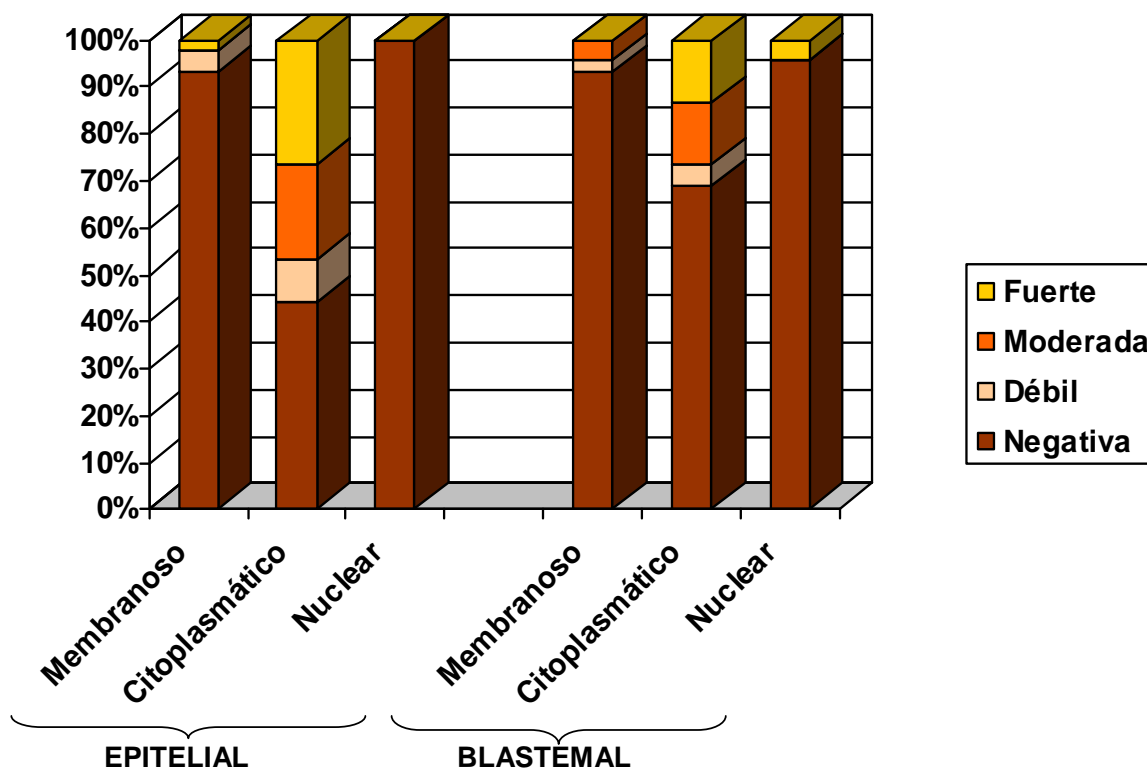
**Tabla 12.** Intensidad del inmunomarcaje de  $\gamma$ -Catenina en el patrón epitelial del nefroblastoma (n=45).

Patrón Epitelial			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
Negativa	42 (93,3)	20 (44,4)	45 (100)
Débil	2 (4,4)	4 (8,9)	0
Moderada	0	9 (20,0)	
Fuerte	1 (2,2)	12 (26,7)	0

**Tabla 13.** Intensidad del inmunomarcaje de  $\gamma$ -Catenina en el patrón blastemal del nefroblastoma (n=45).

Patrón Blastemal			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
Negativa	42 (93,3)	31 (68,9)	43 (95,6)
Débil	1 (2,2)	2 (4,4)	0
Moderada	2 (4,4)	6 (13,3)	0
Fuerte	0	6 (13,3)	2 (4,4)

En los 45 casos analizados, el patrón estromal fue negativo para la inmunoeexpresión de  $\gamma$ -catenina, salvo dos excepciones: 1 caso (2,2%) mostró expresión moderada en el tipo histológico estromal membranoso, y 1 caso (2,2%) también mostró expresión moderada en el tipo histológico estromal citoplásmico.



**Figura 14.** Intensidad del inmunomarcaje de  $\gamma$ -catenina en los diferentes patrones del nefroblastoma.

#### • Evaluación Morfológica de la Expresión de p120 en el Nefroblastoma

En el citoplasma del riñón no neoplásico se observó p120. La expresión de este epítipo fue menor en comparación con el resto de las cateninas y, de hecho, la parte blastemal del nefroblastoma mostró unos pocos casos con inmunorreactividad frente a esta proteína. p120 fue más frecuentemente observada en el citoplasma de las células epiteliales tumorales y se identificó en 23 de los 45 casos estudiados (Tabla 14). A diferencia de lo observado en  $\alpha$ -catenina, el epítipo p120 expresó pocos casos en los elementos blastemales (4 casos). La expresión identificada en los epitelios y en el blastema mostró que la proteína se expresaba de

manera intensa en la membrana celular, tanto en la parte basolateral como en la porción apical de las células. En el citoplasma se observaron finos grumos de la proteína con leve intensidad. Adicionalmente, pudieron identificarse dos casos positivos en la región nuclear (1 caso en las células epiteliales y otro más en las blastemales). El estroma del nefroblastoma mostró 4 casos positivos para este epítipo y pudo observarse en la membrana celular y en el citoplasma (Tabla 16) (Fig.15).

**Tabla 14.** Intensidad del inmunomarcaje de *p120* en el patrón epitelial del nefroblastoma (n=45).

Patrón Epitelial			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
<b>Negativa</b>	44 (97,8)	22 (48,9)	44 (97,8)
<b>Débil</b>	0	13 (28,9)	0
<b>Moderada</b>	0	6 (13,3)	1 (2,2)
<b>Fuerte</b>	1 (2,2)	4 (8,9)	0

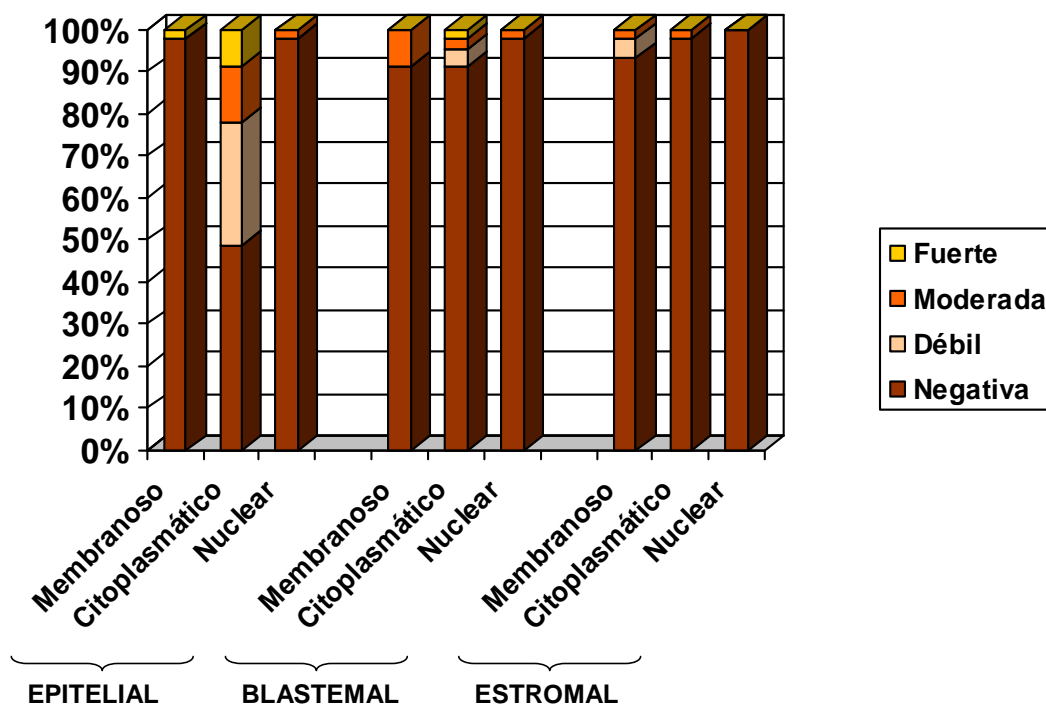
**Tabla 15.** Intensidad del inmunomarcaje de *p120* en el patrón blastemal del nefroblastoma (n=45).

Patrón Blastemal			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
<b>Negativa</b>	41 (91,1)	41 (91,1)	44 (97,8)
<b>Débil</b>	0	2 (4,4)	0
<b>Moderada</b>	4 (8,9)	1 (2,2)	1 (2,2)
<b>Fuerte</b>	0	1 (2,2)	0



**Tabla 16.** Intensidad del inmunomarcaje de *p120* en el patrón estromal del nefroblastoma (n=45).

Patrón Estromal			
Intensidad	Membranoso n (%)	Citoplásmico n (%)	Nuclear n (%)
Negativa	42 (93,3)	44 (97,8)	45 (100)
Débil	2 (4,4)	0	0
Moderada	1 (2,2)	1 (2,2)	0
Fuerte	0	0	0



**Figura 15.** Intensidad del inmunomarcaje de  $\gamma$ -catenina en los diferentes patrones del nefroblastoma.

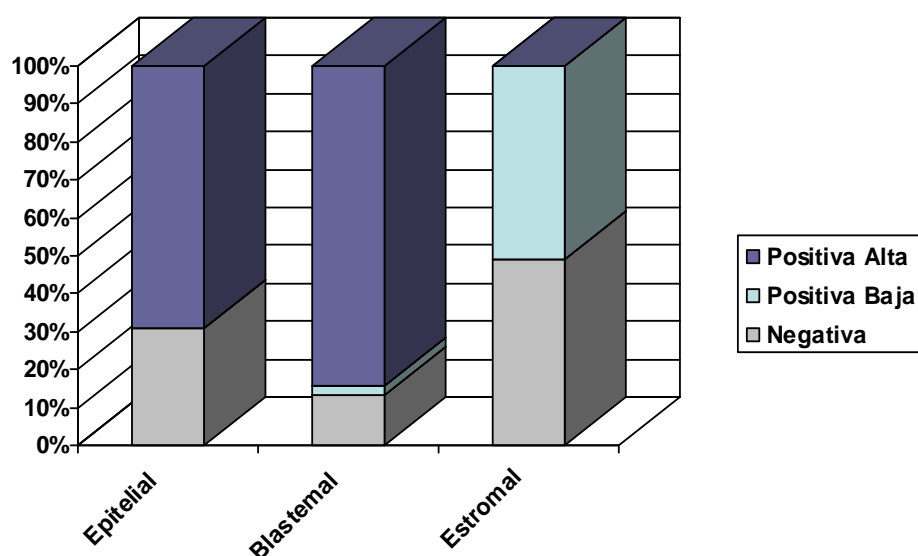
#### • Evaluación Morfológica de la Expresión de Ki 67 en el Nefroblastoma

Además de estudiar las moléculas de adhesión, el índice de proliferación celular también se evaluó en todos los casos de nefroblastoma. Se observó positividad nuclear en todos los casos evaluados; sin embargo, su expresión fue heterogénea pues en cada caso evaluado la

positividad observada predominó solo en uno de los tres componentes histológicos de este tumor. El índice de proliferación celular fue mayor en los islotes blastemales, los cuales corresponden a la parte fenotípica más inmadura del nefroblastoma (Fig. 49). Sin embargo, también los epitelios mostraron alto índice de proliferación, sobre todo cuando los elementos epiteliales eran de apariencia inmadura (Tabla 17). Un caso mostró alto índice de proliferación, tanto en los elementos epiteliales como en los blastematosos, este caso correspondió al único ejemplo de nefroblastoma de histología desfavorable. (Fig.16).

**Tabla 17.** Intensidad del inmunomarcaje de *ki67* en los distintos patrones histológicos del nefroblastoma (n=45).

Patrón histológico			
Intensidad	Epitelial n (%)	Blastemal n (%)	Estromal n (%)
Negativa	14 (31,1)	6 (13,3)	22 (48,9)
Positiva Baja (<20%)	0	1 (2,2)	23 (51,1)
Positiva Alta (≥20%)	31 (68,9)	38 (84,4)	0



**Figura 16.** Intensidad del inmunomarcaje de *ki67* en los diferentes patrones del nefroblastoma.

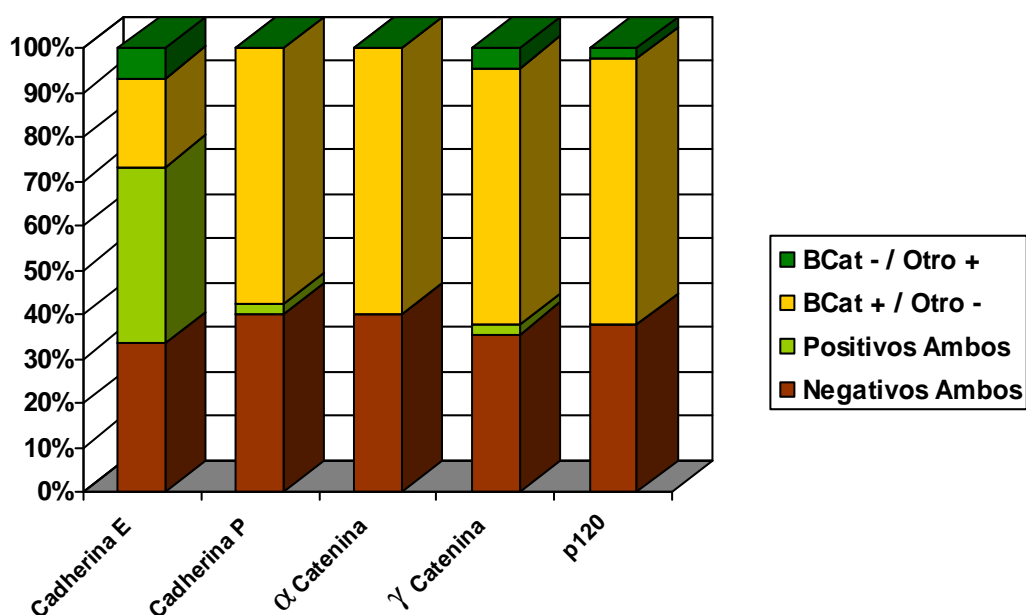
### ***Relación Entre el Perfil de Inmunoexpresión de $\beta$ -Catenina y las Demás Moléculas Estudiadas del Complejo Cadherina-Catenina***

El perfil de expresión de  $\beta$ -catenina en sus diferentes inmunolocalizaciones se ha comparado con el de las demás moléculas estudiadas del complejo cadherina-catenina en los tres patrones histológicos del nefroblastoma. En el nefroblastoma, se ha descrito la expresión de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, el núcleo y la membrana celular, particularmente en las membranas celulares laterales donde  $\beta$ -catenina actúa en los procesos de adhesión celular. En nuestro estudio hemos encontrado expresión de  $\beta$ -catenina en los tres subcompartimentos celulares; los datos más relevantes son los encontrados en la membrana de las células epiteliales del nefroblastoma, donde  $\beta$ -catenina se comportó de manera similar comparada con cadherina-E (Tabla 18 y Fig. 17) aunque la relación no fue estadísticamente significativa; por otro lado, la comparación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y la de cadherina-P,  $\gamma$ -catenina y p120 si fue estadísticamente significativa ( $p<0,001$ ). Datos similares se encontraron en la expresión citoplasmática del patrón epitelial (Tabla 19 y Fig. 18); sin embargo, aunque estos hallazgos son estadísticamente significativos probablemente no posean un significado clínico. La expresión de  $\beta$ -catenina y el resto de las moléculas de adhesión revelaron pobre reactividad en los patrones histológicos blastemal y estromal para las tres localizaciones subcelulares por lo que no es posible compararlas estadísticamente (Tablas 20-25).

**Tabla 18.** Relación entre la expresión de  *$\beta$ -catenina* y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón epitelial membranoso* del nefroblastoma.

Moléculas de Adhesión	$\beta$ CATENINA				
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	$\beta$ Cat+/Fila - n (%)	$\beta$ Cat-/Fila+ n (%)	P
Cadherina E	15 (33,3)	18 (40,0)	9 (20,0)	3 (6,7)	0,146
Cadherina P	18 (40,0)	1 (2,2)	26 (57,8)	0	$p<0,001$
$\alpha$ Catenina	18 (40,0)	0	27 (60,0)	0	NA
$\gamma$ Catenina	16 (35,6)	1 (2,2)	26 (57,8)	2 (4,4)	$p<0,001$
p120	17 (37,8)	0	27 (60,0)	1 (2,2)	$p<0,001$

NA: No Aplicable; NS: No Significativo

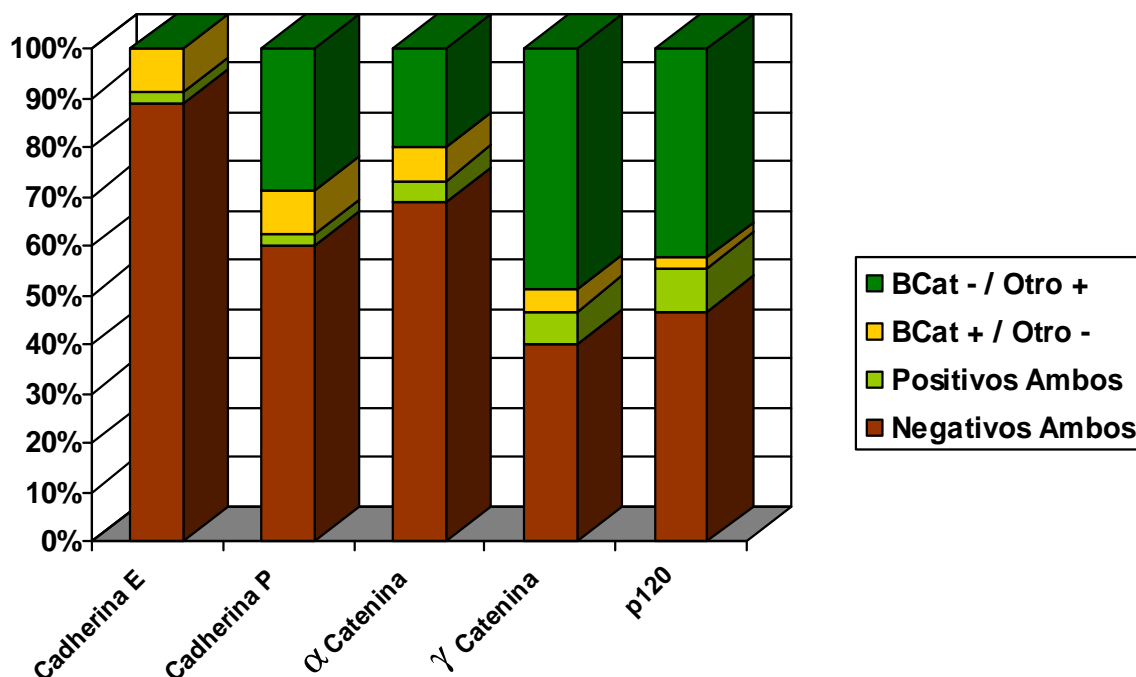


**Figura 17.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón epitelial membranoso* del nefroblastoma.

**Tabla 19.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón epitelial citoplasmático* del nefroblastoma.

Moléculas de Adhesión	$\beta$ CATENINA				P
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	$\beta$ Cat+/Fila - n (%)	$\beta$ Cat-/Fila+ n (%)	
Cadherina E	40 (88,9)	1 (2,2)	4 (8,9)	0	NS
Cadherina P	27 (60,0)	1 (2,2)	4 (8,9)	13 (28,9)	p<0,05
$\alpha$ Catenina	31 (68,9)	2 (4,4)	3 (6,7)	9 (20,0)	NS
$\gamma$ Catenina	18 (40,0)	3 (6,7)	2 (4,4)	22 (48,9)	p<0,001
p120	21 (46,7)	4 (8,9)	1 (2,2)	19 (42,2)	p<0,001

NA: No Aplicable; NS: No Significativo

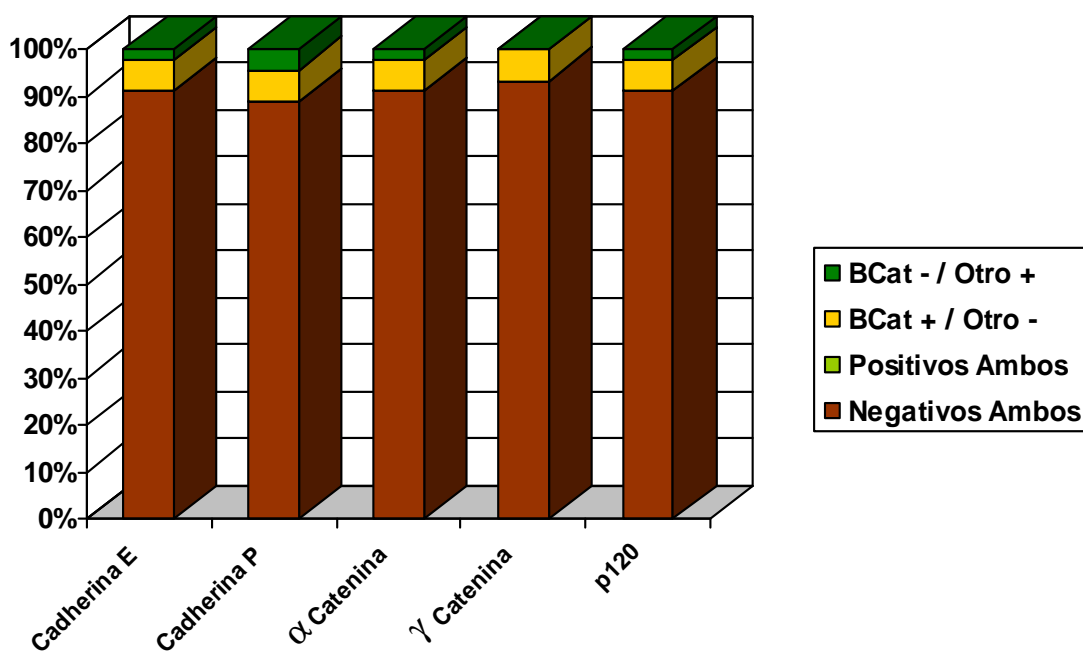


**Figura 18.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón epitelial citoplasmático* del neuroblastoma.

**Tabla 20.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón epitelial nuclear* del neuroblastoma.

Moléculas de Adhesión	$\beta$ CATENINA				
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	$\beta$ Cat+/Fila - n (%)	$\beta$ Cat-/Fila+ n (%)	P
<b>Cadherina E</b>	41 (91,1)	0	3 (6,7)	1 (2,2)	NS
<b>Cadherina P</b>	40 (88,9)	0	3 (6,7)	2 (4,4)	NS
<b><math>\alpha</math> Catenina</b>	41 (91,1)	0	3 (6,7)	1 (2,2)	NS
<b><math>\gamma</math> Catenina</b>	42 (93,3)	0	3 (6,7)	0	NA
<b>p120</b>	41 (91,1)	0	3 (6,7)	1 (2,2)	NS

NA: No Aplicable; NS: No Significativo

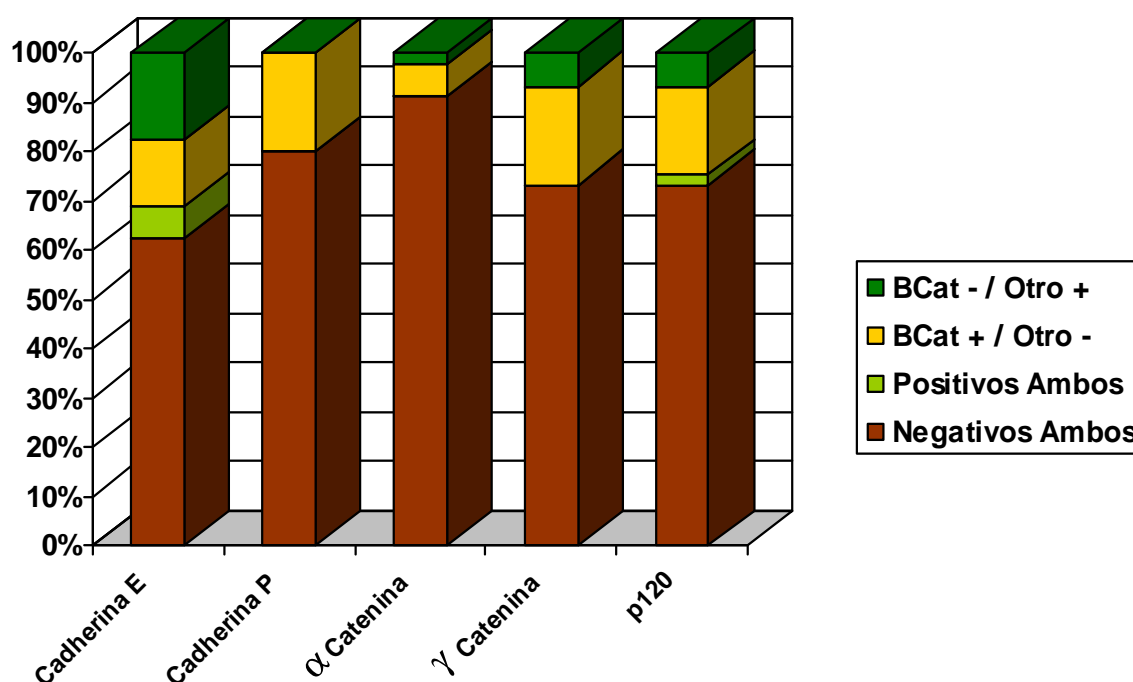


**Figura 19.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón epitelial nuclear* del neuroblastoma.

**Tabla 21.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón blastemal membranoso* del neuroblastoma.

Moléculas de Adhesión	$\beta$ CATENINA				
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	$\beta$ Cat+/Fila - n (%)	$\beta$ Cat-/Fila+ n (%)	P
Cadherina E	28 (62,2)	3 (6,7)	6 (13,3)	8 (17,8)	NS
Cadherina P	36 (80,0)	0	9 (20,0)	0	NA
$\alpha$ Catenina	41 (91,1)	0	3 (6,7)	1 (2,2)	NS
$\gamma$ Catenina	33 (73,3)	0	9 (20,0)	3 (6,7)	NS
p120	33 (73,3)	1 (2,2)	8 (17,8)	3 (6,7)	NS

NA: No Aplicable; NS: No Significativo

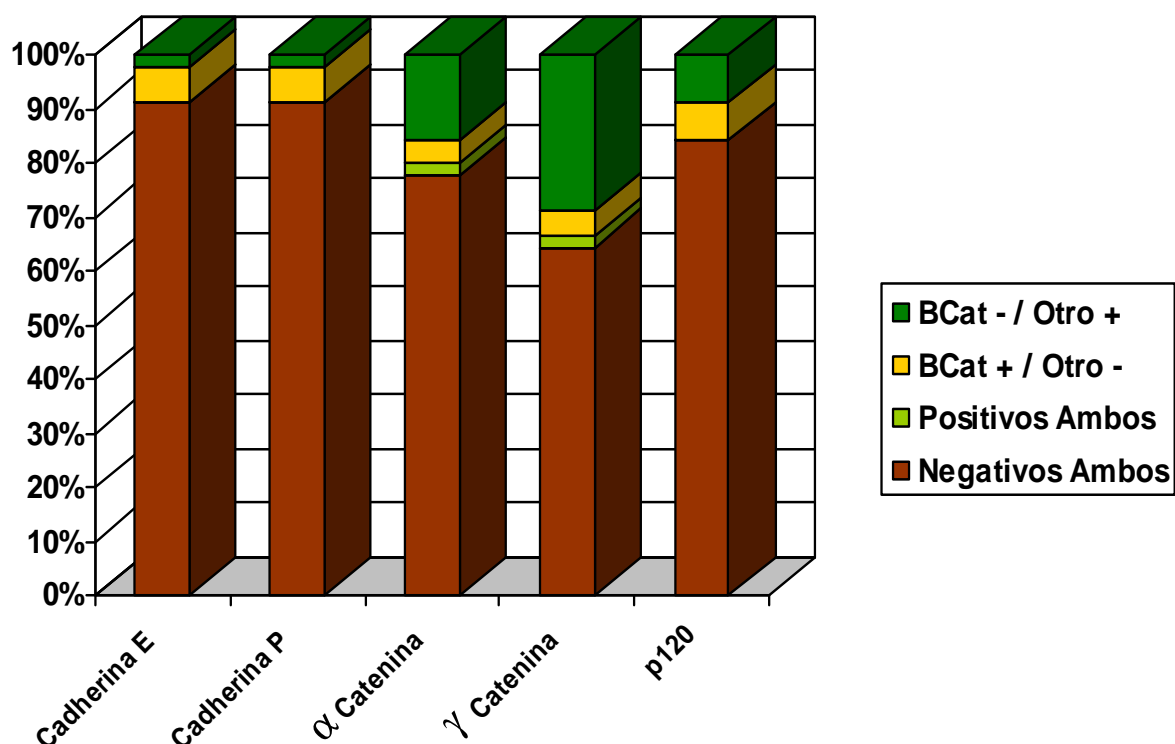


**Figura 20.** Relación entre la expresión de *β-catenina* y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón blastemal membranoso* del neuroblastoma.

**Tabla 22.** Relación entre la expresión de *β-catenina* y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón blastemal citoplasmático* del neuroblastoma.

Moléculas de Adhesión	β CATENINA				
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	β Cat+/Fila - n (%)	β Cat-/Fila+ n (%)	P
Cadherina E	41 (91,1)	0	3 (6,7)	1 (2,2)	NS
Cadherina P	41 (91,1)	0	3 (6,7)	1 (2,2)	NS
α Catenina	35 (77,8)	1 (2,2)	2 (4,4)	7 (15,6)	NS
γ Catenina	29 (64,4)	1 (2,2)	2 (4,4)	13 (28,9)	<0,01
p120	38 (84,4)	0	3 (6,7)	4 (8,9)	NS

NA: No Aplicable; NS: No Significativo



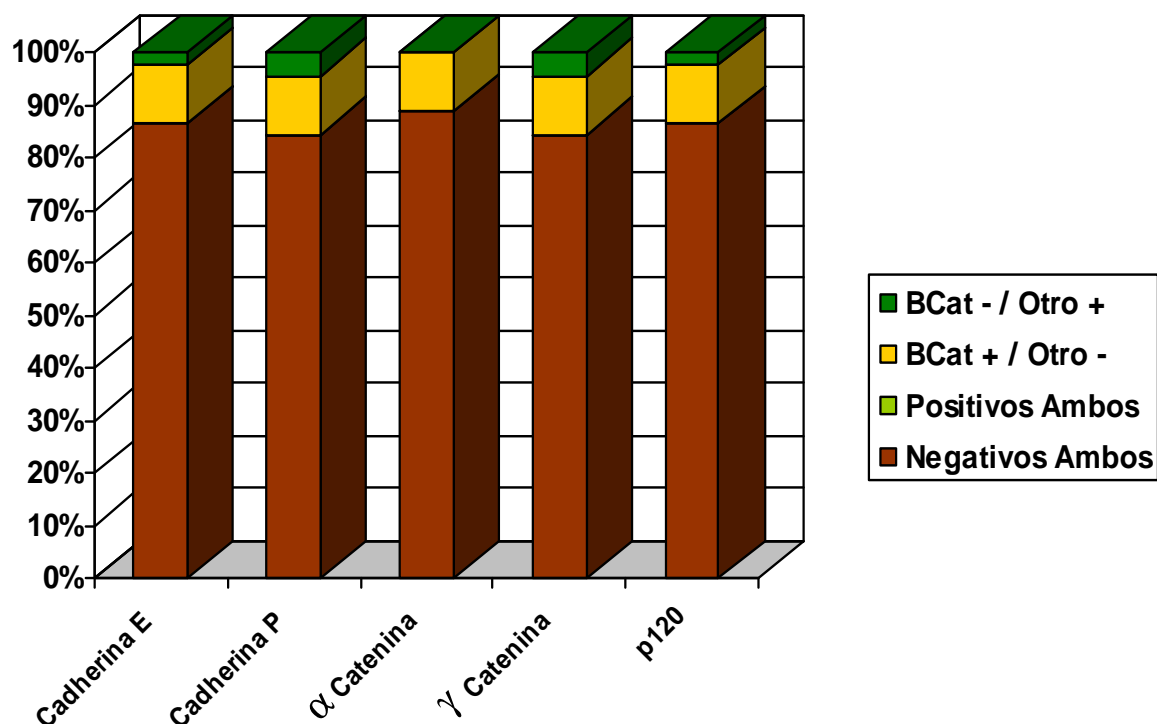
**Figura 21.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón blastemal citoplasmático* del nefroblastoma.

**Tabla 23.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón blastemal nuclear* del nefroblastoma.

Moléculas de Adhesión	$\beta$ CATENINA				P
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	$\beta$ Cat+/Fila - n (%)	$\beta$ Cat-/Fila+ n (%)	
Cadherina E	39 (86,7)	0	5 (11,1)	1 (2,2)	NS
Cadherina P	38 (84,4)	0	5 (11,1)	2 (4,4)	NS
$\alpha$ Catenina	40 (88,9)	0	5 (11,1)	0	NA
$\gamma$ Catenina	38 (84,4)	0	5 (11,1)	2 (4,4)	NS
p120	39 (86,7)	0	5 (11,1)	1 (2,2)	NS

NA: No Aplicable; NS: No Significativo



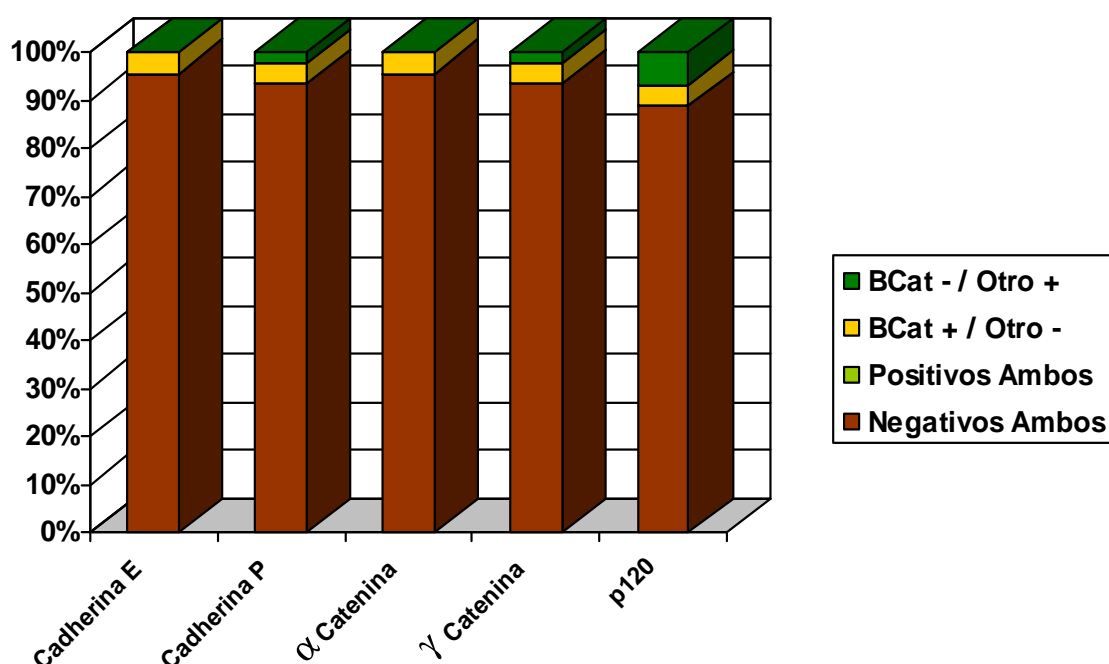


**Figura 22.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón blastemal nuclear* del neuroblastoma.

**Tabla 24.** Relación entre la expresión de  $\beta$ -catenina y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón estromal membranoso* del neuroblastoma.

Moléculas de Adhesión	β CATENINA				
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	β Cat+/Fila - n (%)	β Cat-/Fila+ n (%)	P
<b>Cadherina E</b>	43 (95,6)	0	2 (4,4)	0	NA
<b>Cadherina P</b>	42 (93,3)	0	2 (4,4)	1 (2,2)	NS
<b>α Catenina</b>	43 (95,6)	0	2 (4,4)	0	NA
<b>γ Catenina</b>	42 (93,3)	0	2 (4,4)	1 (2,2)	NS
<b>p120</b>	40 (88,9)	0	2 (4,4)	3 (6,7)	NS

NA: No Aplicable; NS: No Significativo



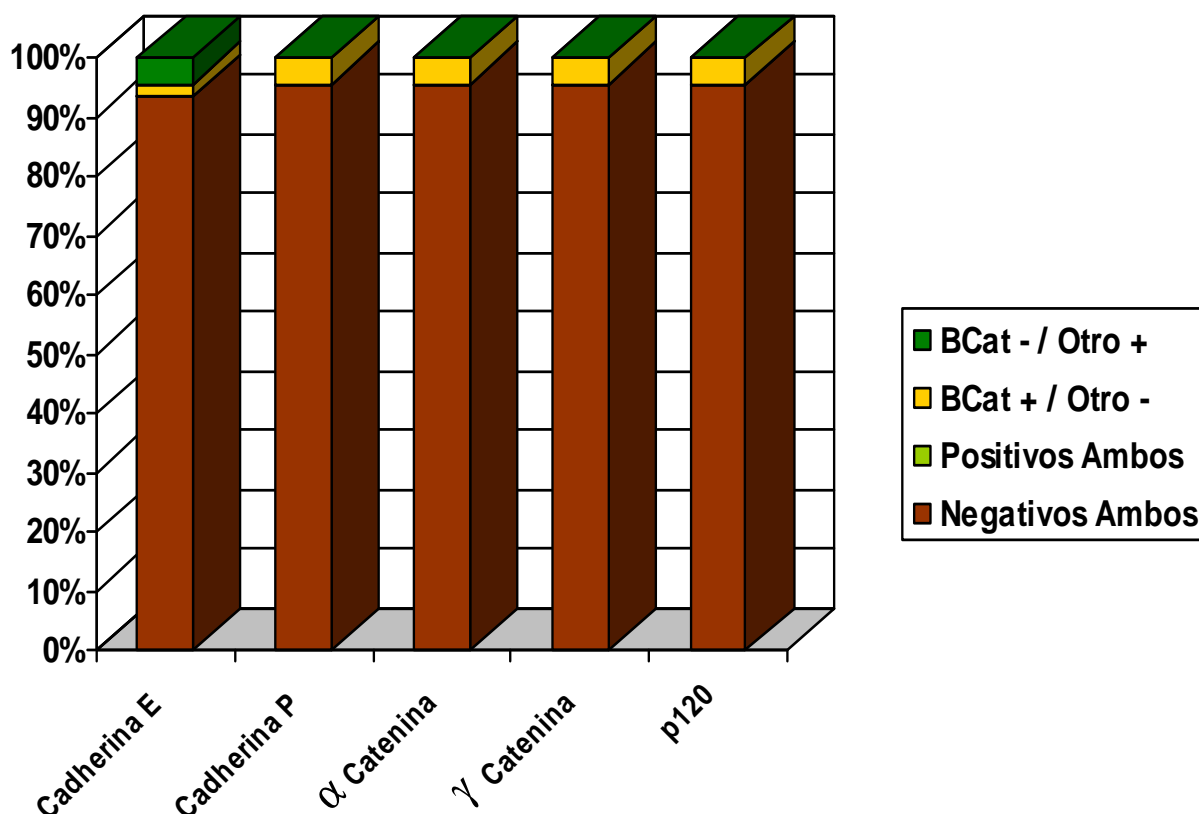
**Figura 23.** Relación entre la expresión de *β-catenina* y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón estromal membranoso* del neuroblastoma.

En el *patrón estromal citoplasmático* no se detectó expresión de *β-catenina* por lo que no se puede obtener la relación entre su expresión y la de las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el neuroblastoma.

**Tabla 25.** Relación entre la expresión de *β-catenina* y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón estromal nuclear* del neuroblastoma.

Moléculas de Adhesión	β CATENINA				
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	β Cat+/Fila - n (%)	β Cat-/Fila+ n (%)	P
Cadherina E	42 (93,3)	0	1 (2,2)	2 (4,4)	NA
Cadherina P	43 (95,6)	0	2 (4,4)	0	NA
α Catenina	43 (95,6)	0	2 (4,4)	0	NA
γ Catenina	43 (95,6)	0	2 (4,4)	0	NA
p120	43 (95,6)	0	2 (4,4)	0	NA

NA: No Aplicable; NS: No Significativo



**Figura 24.** Relación entre la expresión de *β-catenina* y las demás moléculas del complejo Cadherina-Catenina en el *patrón estromal nuclear* del neuroblastoma.

### ***Relación Entre la Inmunoexpresión Membranosa de Cadherina-E y las Cateninas Alfa, Beta, Gamma y p120***

Se ha realizado también la comparación entre la expresión membranosa de cadherina-E y la expresión citoplasmática de las cateninas alfa, beta, gamma y p120 en los tres patrones histológicos del neuroblastoma, epitelial, blastemal y estromal. Entre estos resultados, llama la atención la relación entre la expresión membranosa de cadherina-E y la citoplasmática de  $\gamma$ -catenina tanto en el patrón epitelial ( $p < 0,05$ ), como en el blastemal ( $p < 0,001$ ) (Tablas 26-28).

**Tabla 26.** Relación entre la expresión membranosa de **Cadherina-E** y la expresión citoplasmática de las cateninas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y p120 en el *patrón epitelial* del nefroblastoma.

	CADHERINA-E MEMBRANOSO				
Citoplasmático	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	CadE+/Fila - n (%)	CadE-/Fila+ n (%)	P
$\alpha$ Catenina	17 (37,8)	4 (8,9)	17 (37,8)	7 (15,6)	NS
$\beta$ Catenina	21 (46,7)	2 (4,4)	19 (42,2)	3 (6,7)	NS
$\gamma$ Catenina	14 (31,1)	15 (33,3)	6 (13,3)	10 (22,2)	p<0,05
p120	14 (31,1)	13 (28,9)	8 (17,8)	10 (22,2)	NS

NS: No Significativo

**Tabla 27.** Relación entre la expresión membranosa de **Cadherina-E** y la expresión citoplasmática de las cateninas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y p120 en el *patrón blastemal* del nefroblastoma.

	CADHERINA-E MEMBRANOSO				
Citoplasmático	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	CadE+/Fila - n (%)	CadE-/Fila+ n (%)	P
$\alpha$ Catenina	27 (60,0)	1 (2,2)	10 (22,2)	7 (15,6)	NS
$\beta$ Catenina	32 (71,1)	1 (2,2)	10 (22,2)	2 (4,4)	NS
$\gamma$ Catenina	28 (62,2)	8 (17,8)	3 (6,7)	6 (13,3)	p<0,001
p120	32 (71,1)	2 (4,4)	9 (20,0)	2 (4,4)	NS

NS: No Significativo

**Tabla 28.** Relación entre la expresión membranosa de **Cadherina-E** y la expresión citoplasmática de las cateninas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y p120 en el *patrón estromal* del nefroblastoma.

	CADHERINA-E MEMBRANOSO				
Citoplasmático	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	CadE+/Fila - n (%)	CadE-/Fila+ n (%)	P
$\alpha$ Catenina	44 (97,8)	0	0	1 (2,2)	NA
$\beta$ Catenina	45 (100)	0	0	0	NA
$\gamma$ Catenina	44 (97,8)	0	0	1 (2,2)	NA
p120	44 (97,8)	0	0	1 (2,2)	NA

NA: No Aplicable

### ***Relación de la Expresión de las Moléculas del Complejo Cadherina-Catenina Entre los Tres Compartimentos Celulares***

Para cada una de las moléculas estudiadas del complejo cadherina-catenina se estableció la relación de su expresión en los tres compartimentos celulares, membrana, citoplasma y núcleo. Esta comparación se realizó en los tres patrones histológicos del nefroblastoma, epitelial, blastemal y estromal (Tablas 29-40) (Figs. 25-31).

**Tabla 29a.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina E* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

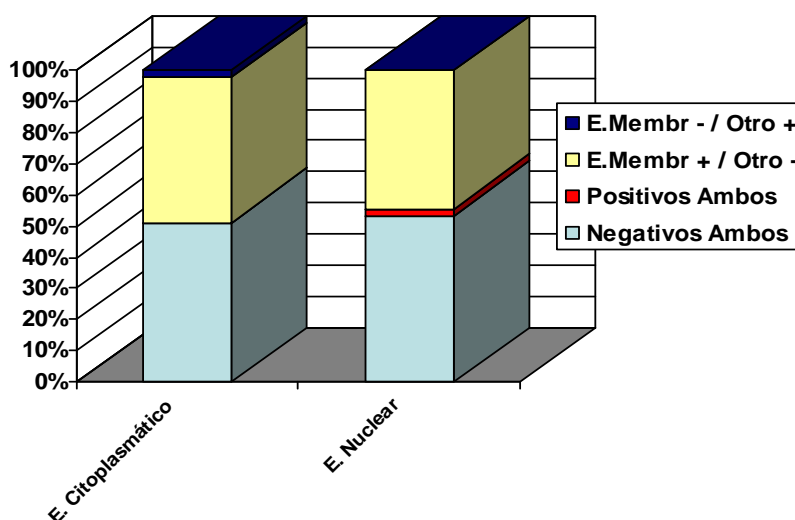
Inmunolocalización	Epitelial Membranoso				P
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Memb+/Fila- n (%)	E.Memb -/Fila+ n (%)	
E. Citoplásmico	23 (51,1)	0	21 (46,7)	1 (2,2)	<0,001
E. Nuclear	24 (53,3)	1 (2,2)	20 (44,4)	0	<0,001

E.: Epitelial; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

**Tabla 29b.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina E* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

Inmunolocalización	Epitelial Citoplásmico				P
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Citop+/Fila- n (%)	E.Citop -/Fila+ n (%)	
E. Nuclear	43 (95,6)	0	1 (2,2)	1 (2,2)	NS

E.: Epitelial; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo



**Figura 25.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina E* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

**Tabla 30a.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina E* en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

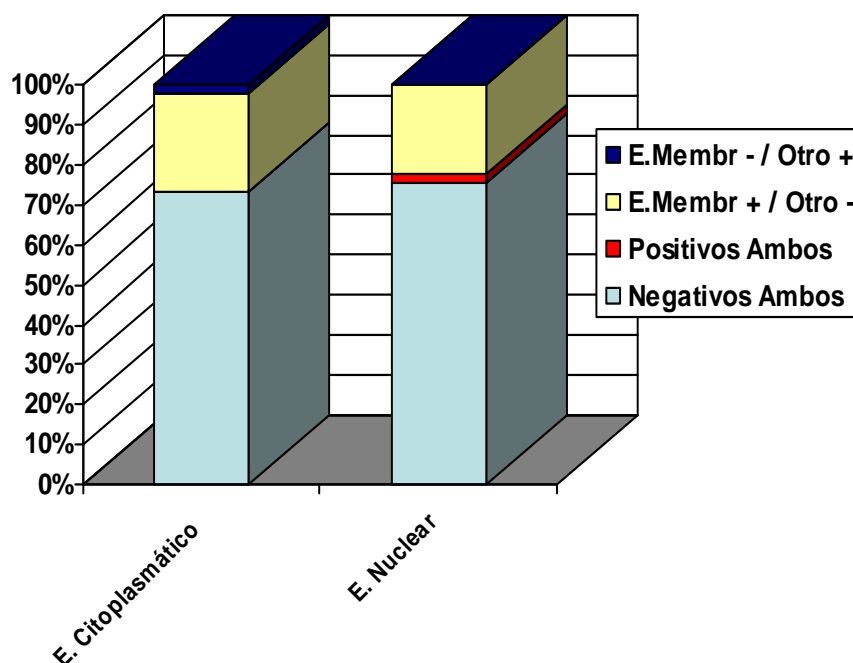
	Blastemal Membranoso				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	B.Memb+/Fila- n (%)	B.Memb -/Fila+ n (%)	P
B. Citoplásmico	33 (73,3)	0	11 (24,4)	1 (2,2)	<0,001
B. Nuclear	34 (75,6)	1 (2,2)	10 (22,2)	0	<0,005

B.: Blastemal; Memb: Membranoso; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

**Tabla 30b.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina E* en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

	Blastemal Citoplásmico				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	B.Citop+/Fila- n (%)	B.Citop -/Fila+ n (%)	P
B. Nuclear	43 (95,6)	0	1 (2,2)	1 (2,2)	NS

B.: Blastemal; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo



**Figura 26.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina E* en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

En el patrón estromal, no se detectó expresión de cadherina E en las regiones membranosa y citoplásmica, por lo que su comparación no es aplicable.

**Tabla 31a.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina P* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

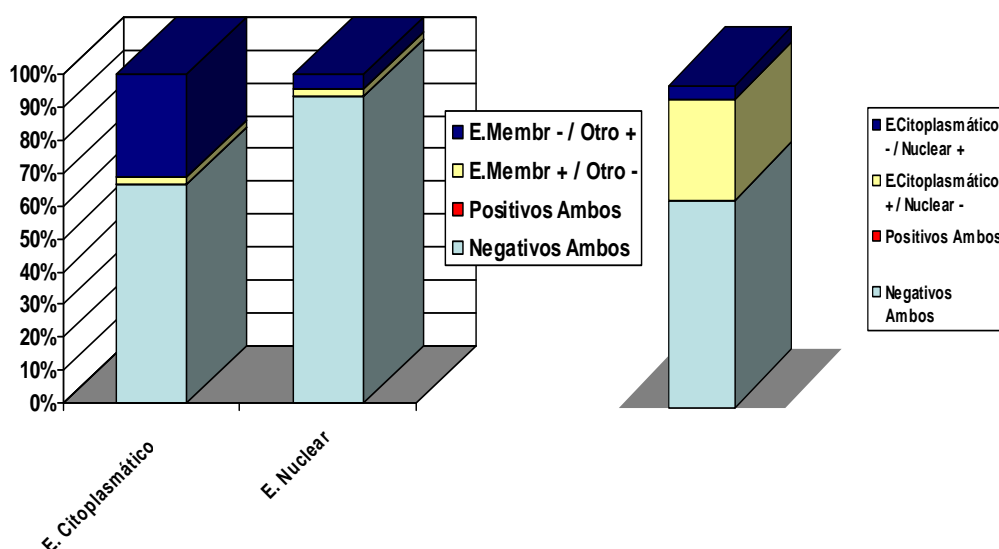
Inmunolocalización	Epitelial Membranoso				P
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Memb+/Fila- n (%)	E.Memb -/Fila+ n (%)	
E. Citoplásmico	30 (66,7)	0	1 (2,2)	14 (31,1)	<0,001
E. Nuclear	42 (93,3)	0	1 (2,2)	2 (4,4)	NS

E.: Epitelial; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

**Tabla 31b.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina P* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

	Epitelial Citoplásmico				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Citop+/Fila- n (%)	E.Citop -/Fila+ n (%)	P
E. Nuclear	29 (64,4)	0	14 (31,1)	2 (4,4)	<0,005

E.: Epitelial; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo



**Figura 27.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina P* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

Cadherina P no mostró inmunolocalización membranosa del patrón blastemal por lo que no se ha podido determinar su relación con la immunoexpresión nuclear y citoplásmica.

**Tabla 32.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina P* en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

	Blastemal Citoplásmico				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	B.Citop+/Fila- n (%)	B.Citop -/Fila+ n (%)	P
B. Nuclear	42 (93,3)	0	1 (2,2)	2 (4,4)	NS

B.: Blastemal; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo



**Tabla 33.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *Cadherina P* en el *Patrón Estromal* del nefroblastoma.

	Estromal Citoplásmico				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	Est.Citop+/Fila- n (%)	Est.Citop -/Fila+ n (%)	P
Est. Membranoso	44 (97,8)	1 (2,2)	0	0	NS

Est.: Estromal; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

El patrón estromal no demostró inmunolocalización nuclear de cadherina P por lo que no se ha podido determinar su relación con la expresión membranosa y citoplásmica.

**Tabla 34.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de  *$\alpha$ -Catenina* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

	Epitelial Citoplásmico				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Citop+/Fila- n (%)	E.Citop -/Fila+ n (%)	P
E. Nuclear	33 (73,3)	0	1 (2,2)	11 (24,4)	<0,01

E.: Epitelial; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

$\alpha$ -Catenina no mostró inmunolocalización membranosa en el patrón epitelial por lo que no se ha podido determinar su relación con la expresión nuclear y citoplasmática. Así mismo, la inmunolocalización membranosa y nuclear de  $\alpha$ -catenina en el patrón estromal del nefroblastoma tampoco fue observada por lo que no se ha podido determinar su relación.

**Tabla 35a.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de  *$\beta$ -Catenina* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

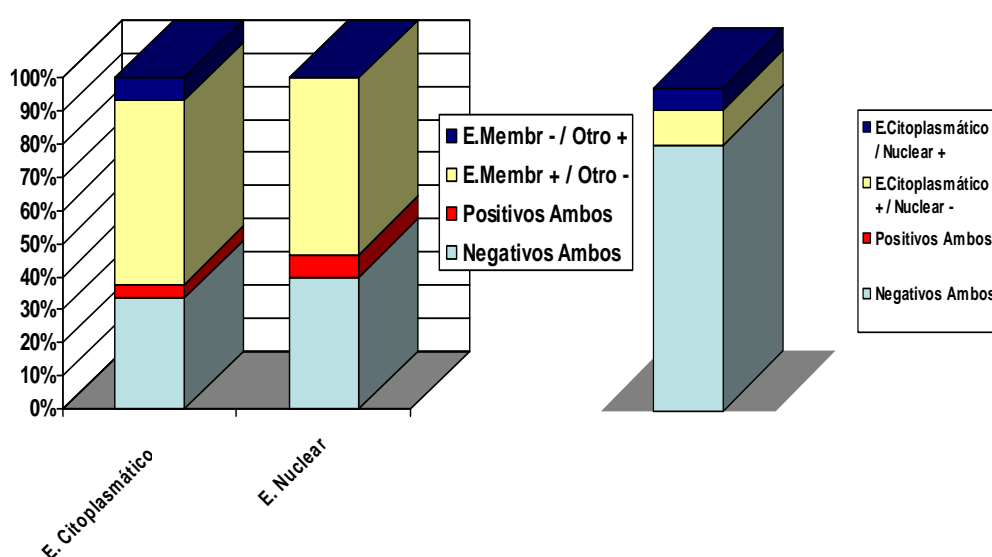
	Epitelial Membranoso				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Memb+/Fila- n (%)	E.Memb -/Fila+ n (%)	P
E. Citoplásmico	15 (33,3)	2 (4,4)	25 (55,6)	3 (6,7)	<0,001
E. Nuclear	18 (40,0)	3 (6,7)	24 (53,3)	0	<0,001

E.: Epitelial; Memb.: Membranoso

**Tabla 35b.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de  $\beta$ -Catenina en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

	Epitelial Citoplásmico				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Citop+/Fila- n (%)	E.Citop -/Fila+ n (%)	P
E. Nuclear	37 (82,2)	0	5 (11,1)	3 (6,7)	NS

E.: Epitelial; NS: No Significativo



**Figura 28.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de  $\beta$ -Catenina en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

**Tabla 36a.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de  $\beta$ -Catenina en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

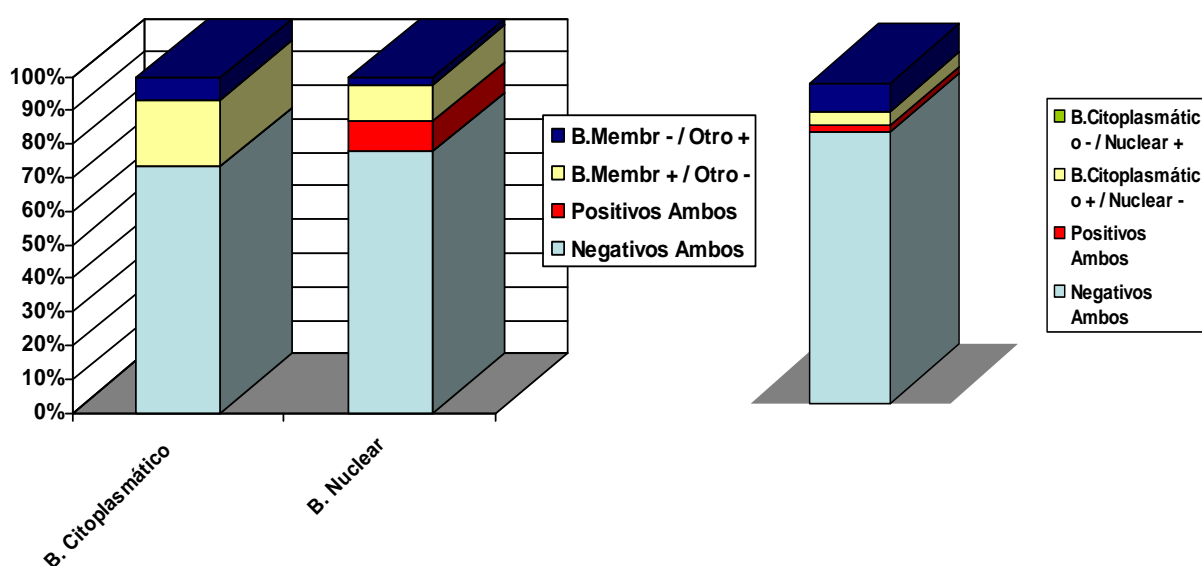
	Blastemal Membranoso				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	B.Memb+/Fila- n (%)	B.Memb -/Fila+ n (%)	P
B. Citoplásmico	33 (73,3)	0	9 (20,0)	3 (6,7)	NS
B. Nuclear	35 (77,8)	4 (8,9)	5 (11,1)	1 (2,2)	NS

B.: Blastemal; Memb: Membranoso; NS: No Significativo

**Tabla 36b.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de  $\beta$ -Catenina en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

	Blastemal Citoplásmico				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	B.Citop+/Fila- n (%)	B.Citop -/Fila+ n (%)	P
B. Nuclear	38 (84,4)	1 (2,2)	2 (4,4)	4 (8,9)	NS

B.: Blastemal; Citop: Citoplásmico; NS: No Significativo



**Figura 29.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de  $\beta$ -Catenina en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

**Tabla 37.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de  $\beta$ -Catenina en el *Patrón Estromal* del nefroblastoma.

	Estromal Membranoso				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	Est.Memb+/Fila- n (%)	Es.Memb -/Fila+ n (%)	P
Est. Nuclear	42 (93,3)	1 (2,2)	1 (2,2)	1 (2,2)	NS

Est.Memb: Estromal Membranoso; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

No se detectó inmunolocalización citoplásmica de  $\beta$ -catenina en el patrón estromal por lo que no se ha podido determinar su relación con la expresión nuclear y membranosa.

**Tabla 38a.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *p120* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

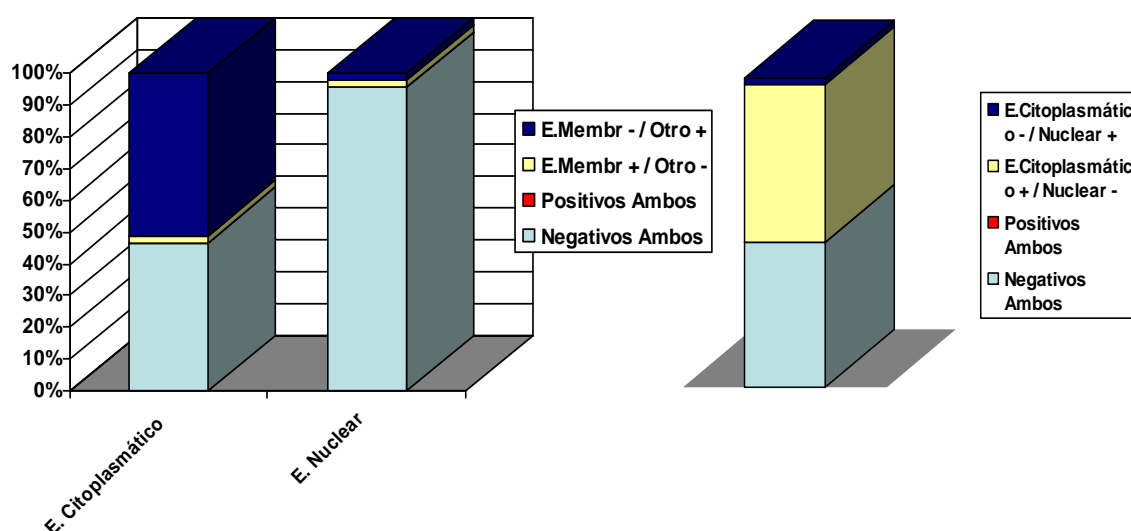
Inmunolocalización	Epitelial Membranoso				P
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Memb+/Fila- n (%)	E.Memb -/Fila+ n (%)	
E. Citoplásmico	21 (46,7)	0	1 (2,2)	23 (51,1)	<0,001
E. Nuclear	43 (95,6)	0	1 (2,2)	1 (2,2)	NS

E.: Epitelial; Memb: Membranoso; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

**Tabla 38b.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *p120* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

Inmunolocalización	Epitelial Citoplásmico				P
	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	E.Citop+/Fila- n (%)	E.Citop -/Fila+ n (%)	
E. Nuclear	21 (46,7)	0	23 (51,1)	1 (2,2)	<0,001

E.: Epitelial; NA: No Aplicable; NS: No Significativo



**Figura 30.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *p120* en el *Patrón Epitelial* del nefroblastoma.

**Tabla 39a.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *p120* en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

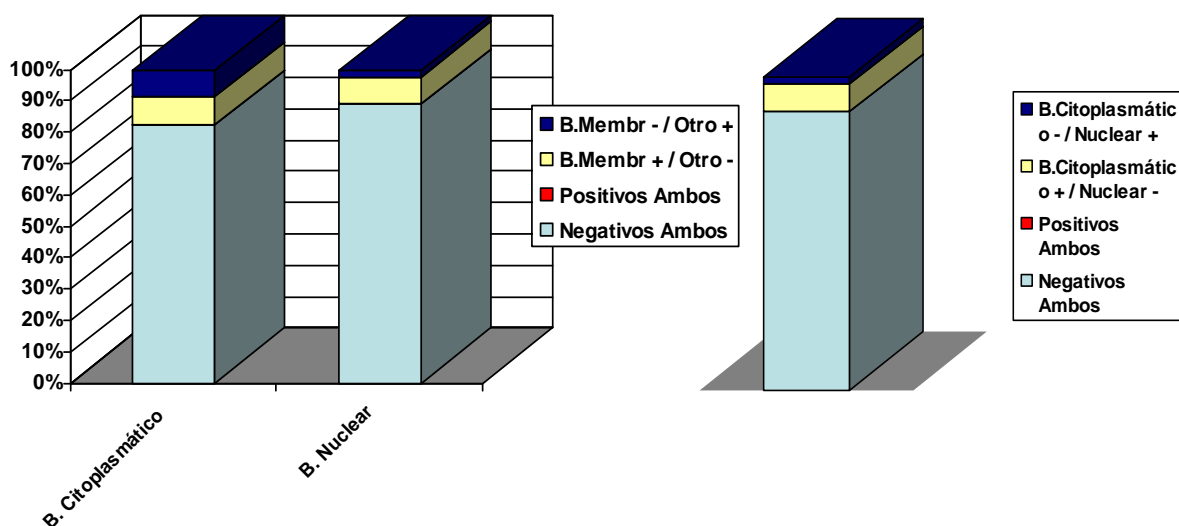
	Blastemal Membranoso				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	B.Membr+/Fila- n (%)	B.Membr -/Fila+ n (%)	P
B. Citoplásmico	37 (82,2)	0	4 (8,9)	4 (8,9)	NS
B. Nuclear	40 (88,9)	0	4 (8,9)	1 (2,2)	NS

B.: Blastemal; Memb: Membranoso; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

**Tabla 39b.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *p120* en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

	Blastemal Citoplásmico				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	B.Citop+/Fila- n (%)	B.Citop -/Fila+ n (%)	P
B. Nuclear	40 (88,9)	0	4 (8,9)	1 (2,2)	NS

B.: Blastemal; Citop: Citoplásmico; NA: No Aplicable; NS: No Significativo



**Figura 31.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *p120* en el *Patrón Blastemal* del nefroblastoma.

**Tabla 40.** Relación entre las distintas inmunolocalizaciones de *p120* en el *Patrón Estromal* del nefroblastoma.

	Estromal Membranoso				
Inmunolocalización	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	Est.Memb+/Fila- n (%)	Es.Memb -/Fila+ n (%)	P
Est. Citoplásmico	41 (91,1)	0)	3 (6,7)	1 (2,2)	NS

Est.Memb: Estromal Membranoso; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

En el patrón estromal del nefroblastoma no se detectó expresión nuclear de p120 por lo que no se ha podido determinar su relación con la expresión membranosa y citoplasmática.

### ***Relación Entre la Expresión de Ki67 en los Distintos Patrones Histológicos del Nefroblastoma***

Los resultados de la comparación de la expresión de Ki67 entre los patrones histológicos epitelial, blastemal y estromal se muestran en las Tablas 41a y b, y Fig. 32.

**Tabla 41a.** Relación entre la expresión de *Ki67* en los distintos patrones del nefroblastoma.

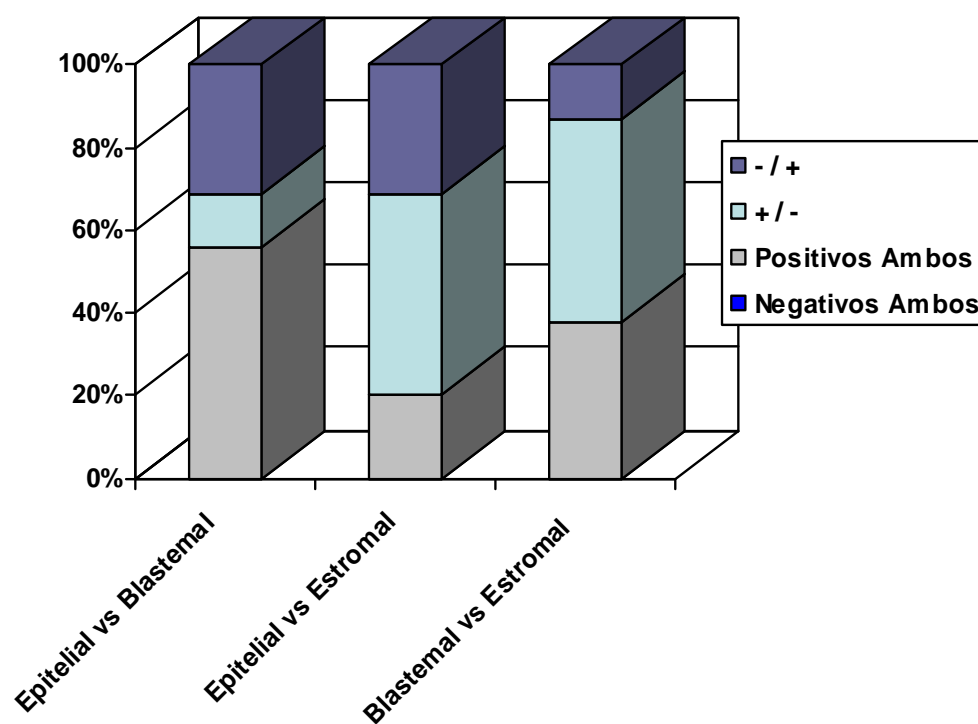
	Patrón Epitelial				
Patrón	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	P.Epit+/Fila- n (%)	P.Epit-/Fila+ n (%)	P
Blastemal	0	25 (55,6)	6 (13,3)	14 31,1)	NS
Estromal	0	9 (20,0)	22 (48,9)	14 31,1)	NS

P.Epit: Patrón Epitelial; NA: No Aplicable; NS: No Significativo

**Tabla 41b.** Relación entre la expresión de *Ki67* en los distintos patrones del nefroblastoma.

	Patrón Blastemal				
Patrón	Negativos Ambos n (%)	Positivos Ambos n (%)	P.Blast+/Fila- n (%)	P.Blast-/Fila+ n (%)	P
Estromal	0	17 (37,8)	22 (48,9)	6 (13,3)	<0,005

P.Blast: Patrón Blastemal; NA: No Aplicable; NS: No Significativo



**Figura 32.** Relación entre la expresión de *Ki67* en los distintos patrones del nefroblastoma.

## **ICONOGRAFÍA**



***Fig. 33. Características histopatológicas del nefroblastoma***

a) Tumor de Wilms trifásico de histología favorable. Se observan los tres elementos clásicos del nefroblastoma, la esquina inferior izquierda exhibe una hoja sólida de células primitivas de aspecto sincitial, la esquina superior derecha muestra haces irregulares de células fusocelulares que representan un mesénquima primitivo, el centro de la figura exhibe dos túbulos simples así como una estructura glomeruloide. Hematoxilina-Eosina. 20X.

**b)** Nefroblastoma de histología favorable. A mayor aumento, se observan mejor las características del blastema renal (mitad izquierda de la figura). La imagen muestra como una hoja sólida homogénea de células grandes primitivas y sincitiales con actividad mitótica frecuente se encuentra rodeando los elementos epiteliales, un túbulo simple y un glomérulo de aspecto abortivo. Hematoxilina-Eosina. 40X.

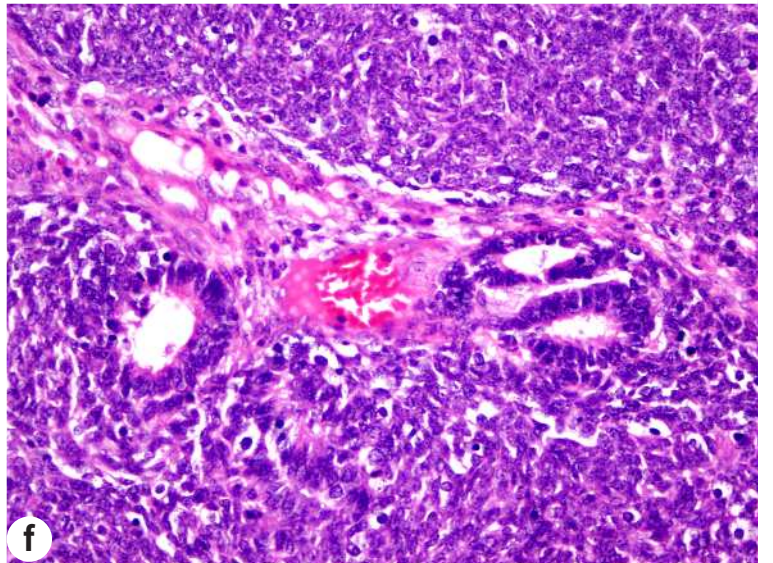
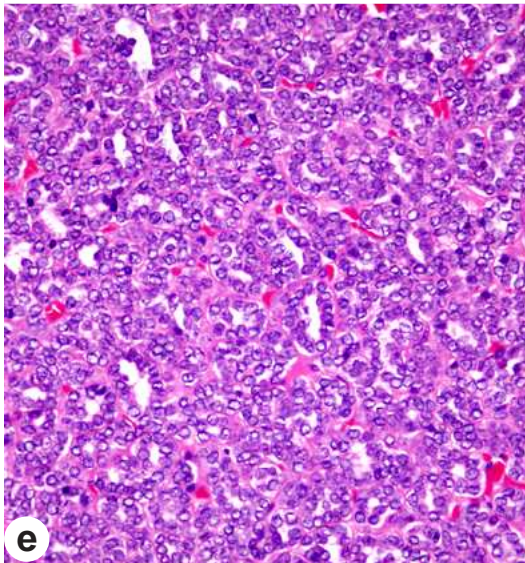
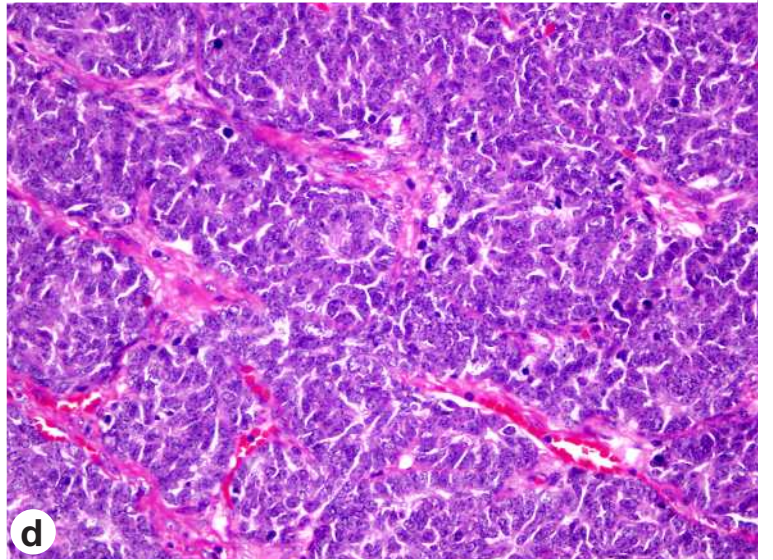
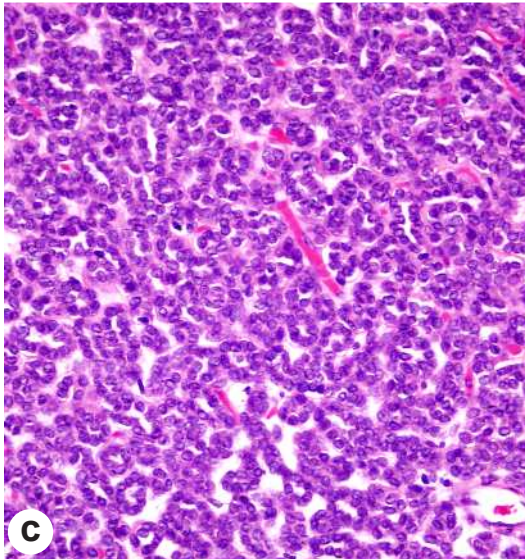
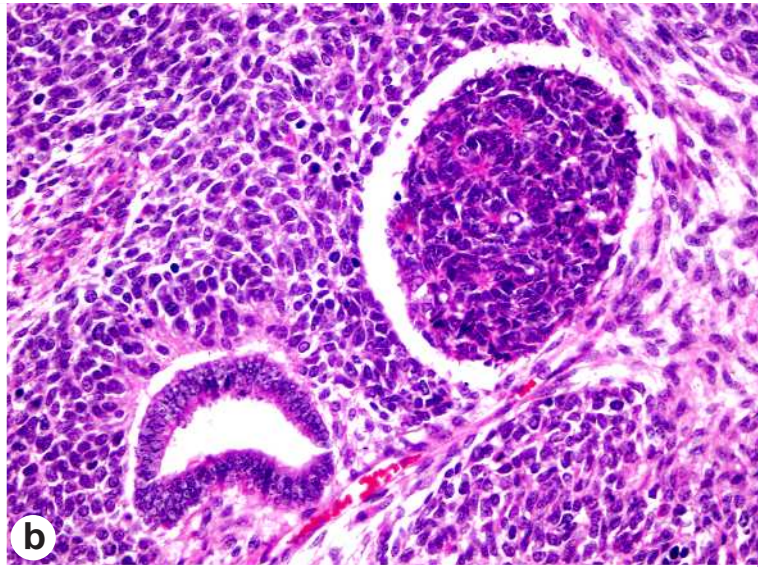
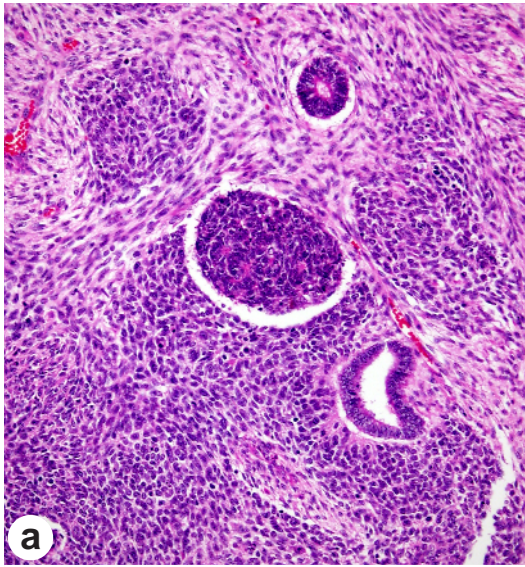
**c)** Nefroblastoma de histología favorable en el que predomina el patrón de crecimiento epitelial; nótese los pequeños túbulos de aspecto inmaduro y anastomosados revestidos por células cilíndricas bajas con mínima atipia, el estroma circundante es escaso. Hematoxilina-Eosina. 20X.

**d)** Nefroblastoma de histología favorable. A mayor aumento, se identifican estructuras tubulares o pseudoglandulares de apariencia inmadura, apenas perceptibles, entremezcladas con células blastematosas, estas últimas exhiben atipia marcada y mitosis frecuentes. El estroma es prominente, está ricamente vascularizado y rodea a los elementos epiteliales y blastematosos formando nódulos. Hematoxilina-Eosina. 40X.

**e)** Nefroblastoma de histología favorable. Los túbulos simples, formados por células cúbicas con patrón de crecimiento de “espalda con espalda”, mostrados en esta figura recuerdan el riñón en desarrollo en etapas tempranas; Nótese además que el fino estroma fibroso que rodea a los elementos epiteliales posee una rica trama de pequeños vasos sanguíneos distribuidos de manera uniforme. Hematoxilina-Eosina. 20X.

**f)** Nefroblastoma de histología favorable. En esta imagen, los túbulos y el blastema renal recuerdan la etapa crucial de transformación mesénquimo-epitelial del riñón en desarrollo. Las dos hojas de blastema renal (porción superior e inferior de la figura) se encuentran divididas por toscos tabiques de tejido fibro-conectivo con una gran trama vascular prominente y estrechamente relacionada con los elementos epiteliales mostrados en la parte central de la imagen. Obsérvese también que el blastema es mitóticamente activo. Hematoxilina-Eosina. 20X.







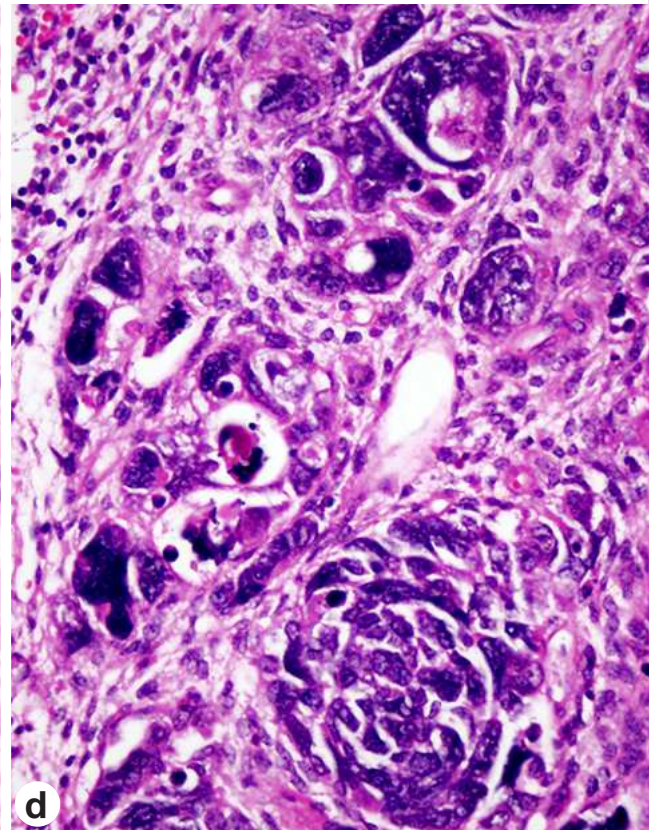
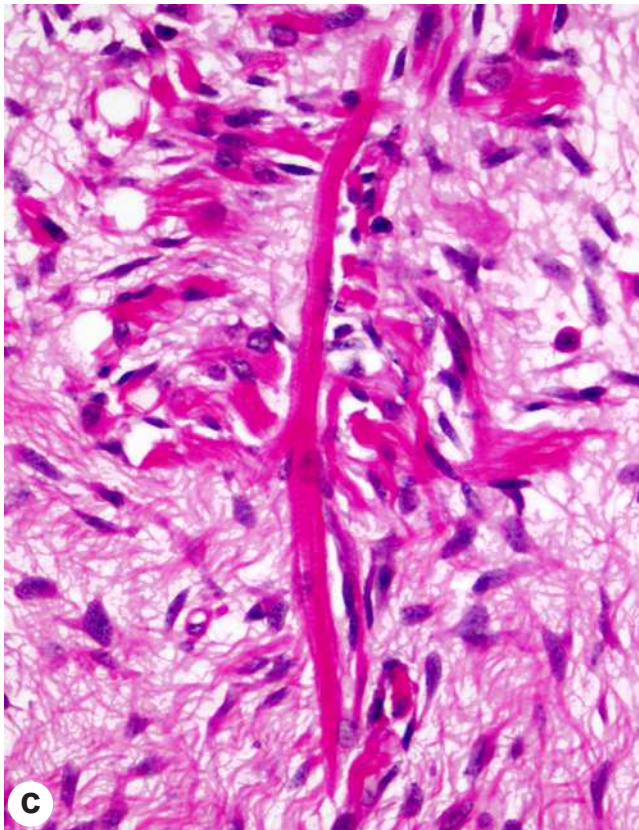
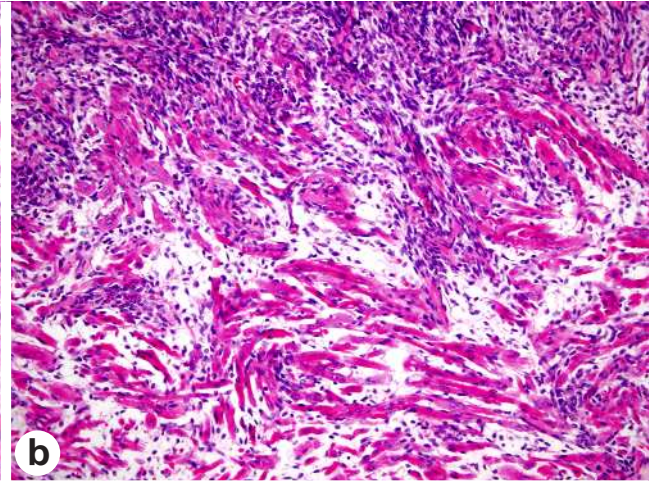
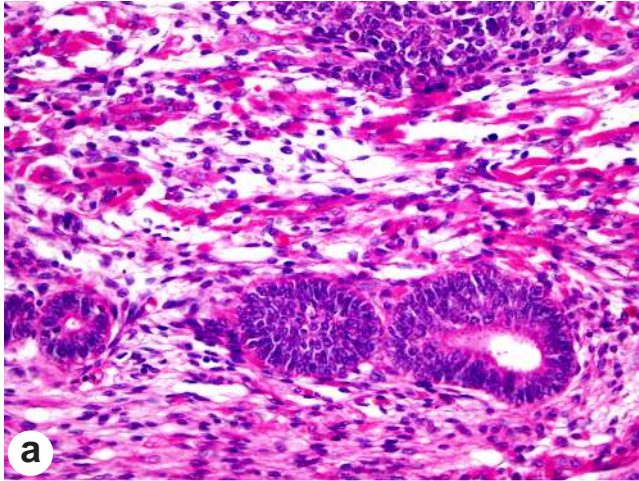
***Fig. 34. Características histopatológicas del nefroblastoma***

**a)** Nefroblastoma de histología favorable donde se aprecia el contraste entre los elementos epiteliales inmaduros, representados aquí por un túbulo simple seccionado longitudinalmente y revestido por células cilíndricas; el patrón estromal circundante en la porción inferior de la figura es indiferenciado, mientras que en la porción superior exhibe diferenciación rabdomioblástica; nótese además el nódulo blastemal. Hematoxilina-Eosina. 20X.

**b)** Nefroblastoma de histología favorable. En esta imagen el tumor mostrado es de predominio estromal; sin embargo, nótese como en la mitad superior de la imagen el estroma es indiferenciado y existe progresión con tendencia a la maduración, en este caso es evidente la citodiferenciación hacia elementos rabdomioblásticos. Hematoxilina-Eosina. 10X.

**c)** Nefroblastoma de histología favorable y de predominio estromal con franca maduración de los elementos heterólogos; la elongación y las estriaciones mostradas en estas células delatan su diferenciación rabdomioblástica, los elementos que rodean a las células rabdomioblásticas muestran características fibroblásticas. Hematoxilina-Eosina. 40X.

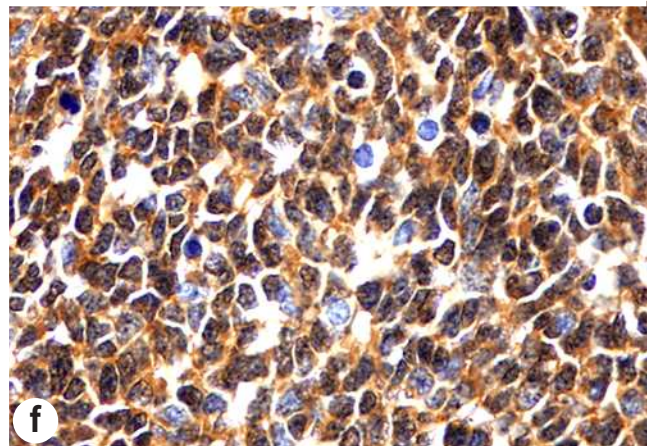
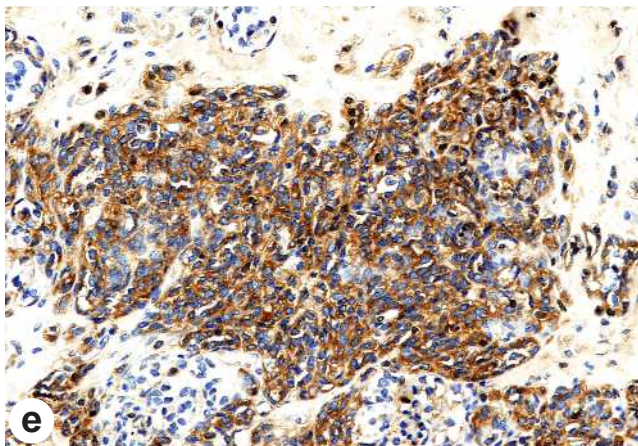
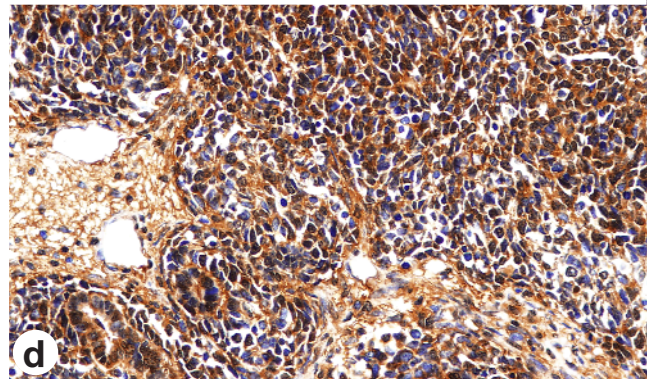
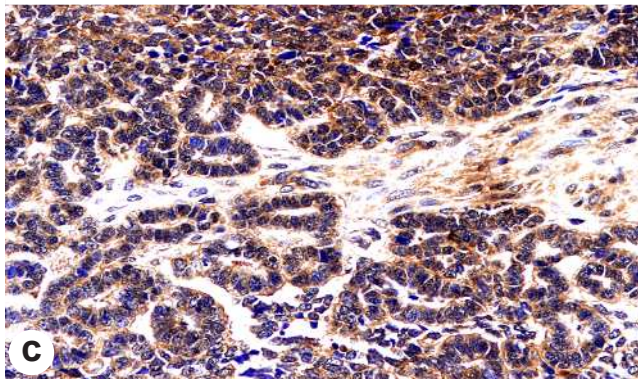
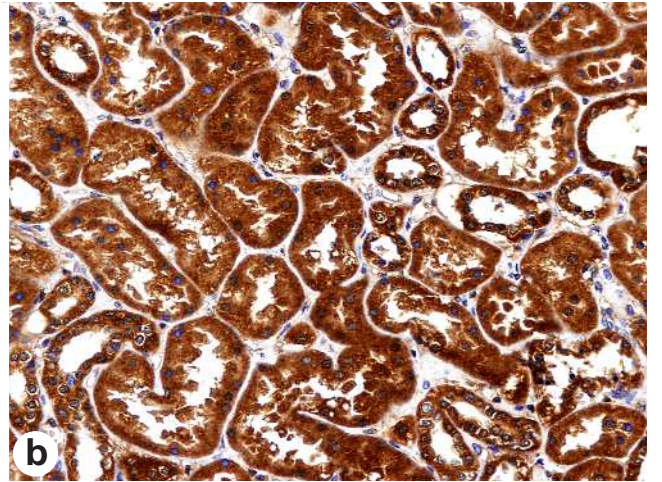
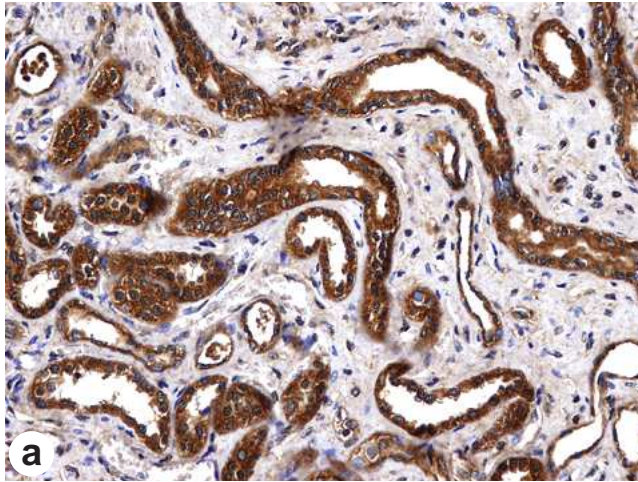
**d)** Nefroblastoma de histología desfavorable. En esta imagen pueden observarse elementos epiteliales indiferenciados, así como un nódulo blastematoso; nótese el evidente gigantismo nuclear que sobrepasa en más del doble al tamaño nuclear promedio, además existen mitosis atípicas multipolares, ambas características definen los cambios histológicos de la histología desfavorable en el nefroblastoma. Hematoxilina-Eosina. 20X.



***Fig. 35. Expresión de alfa-catenina en el nefroblastoma***

- a) Vista panorámica que muestra una médula renal no neoplásica con sendos túbulos moderadamente dilatados y de trayecto tortuoso entre el intersticio fibroso; las células epiteliales cúbicas que revisten estos túbulos son francamente positivas en la región intracitoplásmica con grumos toscos. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- b) La imagen aquí presentada corresponde al mismo caso de la figura anterior; en esta panorámica se muestra la corteza renal de un riñón no tumoral, los túbulos exhiben positividad intracitoplásmica de distribución homogénea con grumos gruesos que es tan intensa que casi no permite visualizar los núcleos; el estroma adyacente presenta nula reactividad. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- c) El patrón epitelial aquí mostrado y representado por estructuras tubulares sencillas revestidas por células cúbicas exhibe positividad muy débil, predominantemente en la región intracitoplásmica y sólo focalmente (mitad inferior). Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- d) Se observa un nefroblastoma trifásico pero de predominio blastemal, solamente los elementos epiteliales y blastemales son moderadamente positivos y en intensidad similar, el escaso estroma y los vasos sanguíneos aquí mostrados son negativos. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- e) Esta imagen muestra un nódulo constituido por numerosos túbulos pequeños simples de aspecto primitivo y formados por epitelio cúbico; la positividad citoplásmica es moderada y de intensidad variable, las estructuras glomeruloides de la esquina superior izquierda y el estroma son negativas. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- f) Se aprecia una hoja sólida de células blastemales primitivas y de marcada atipia, la positividad para el epítipo alfa catenina es moderada y de distribución variable; algunas de las células han resultado negativas. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.

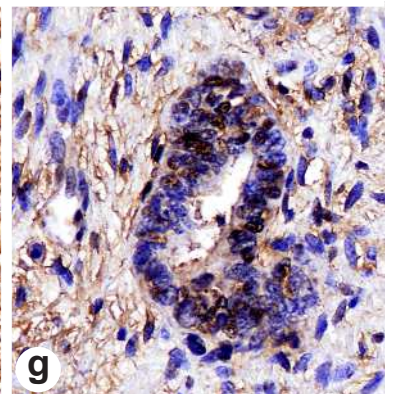
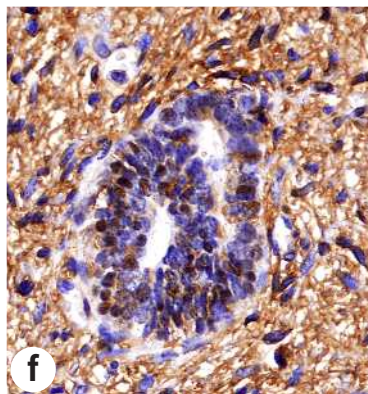
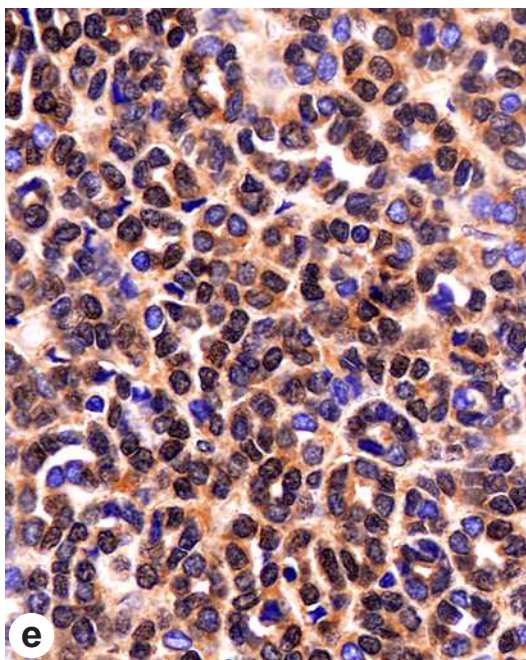
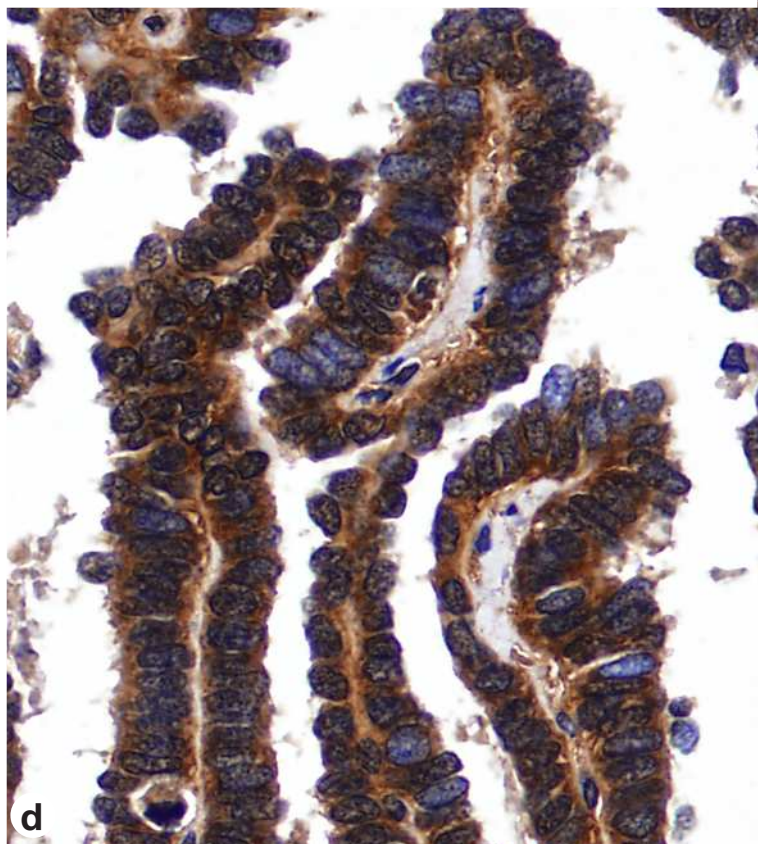
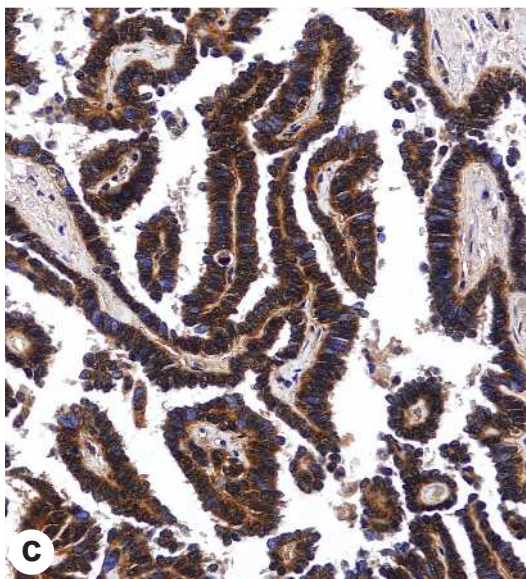
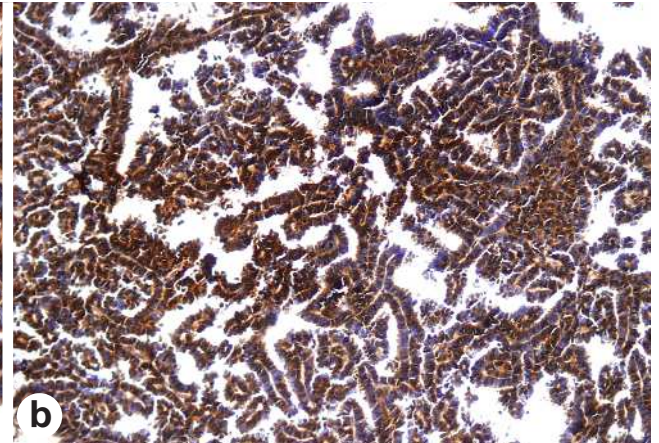
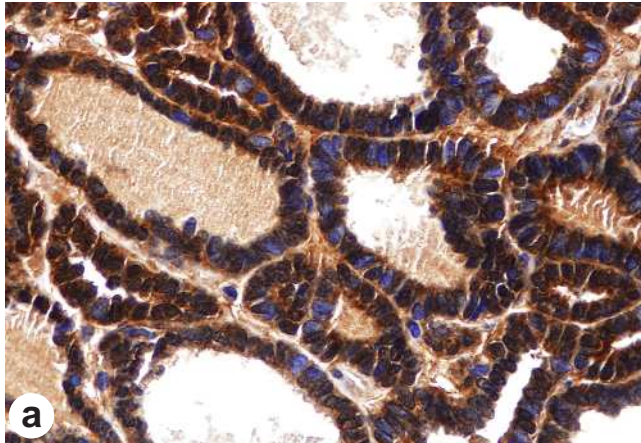




***Fig. 36. Expresión de alfa-catenina en el nefroblastoma***

- a) En esta figura se identifican secciones transversales de túbulos simples dilatados y revestidos por un epitelio cúbico con muy escaso estroma fibrovascular entre ellos, la positividad para el epítotope alfa-catenina es intensa. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- b) Vista panorámica de un nefroblastoma de predominio epitelial. Los elementos epiteliales que se observans muestran túbulos y estructuras papilares complejas y arborescentes de apariencia madura, y están revestidas por células cilíndricas que se apoyan sobre estroma fibroso discretamente vascularizado; nótese la positividad citoplásmica. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 20X.
- c) Esta figura exhibe papilas complejas filiformes, las células cilíndricas que revisten las papilas son levemente positivas, mientras que el estroma muestra nula reactividad para la proteína. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- d) Imagen a gran aumento de la figura anterior, se identifican cortes longitudinales de las puntas de unas papilas, las células son inmunoreactivas con grumos finos y gruesos intracitoplásmicos. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- e) Esta fotomicrografía muestra una hoja sólida de elementos blastemales y epiteliales con formaciones pseudoglandulares de apariencia primitiva, ambos componentes apenas exhiben débil positividad intracitoplasmica. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- f) En esta figura pueden verse dos estructuras tubulares con patrón de “glándula en glándula”, formadas por células cilíndricas y rodeadas por estroma fibroso inmaduro, el cual muestra positividad citoplásmica mientras que las células de los túbulos presentan fuerte positividad nuclear. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.
- g) A gran aumento, en esta fotomicrografía de un nefroblastoma bifásico se muestran la parte estromal y un elemento epitelial revestido por una sola capa de células cilíndricas, ambos elementos exhiben potente positividad nuclear aunque focalizada. Anti- alfa-catenina-Hematoxilina. 40X.

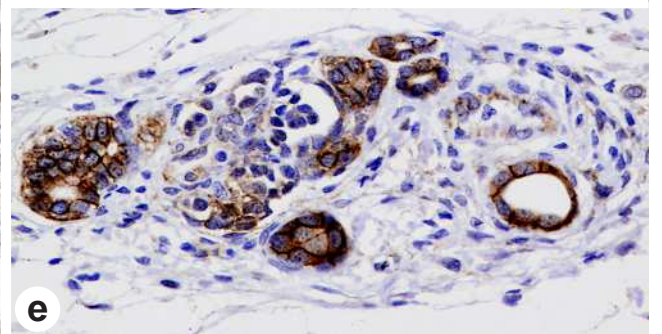
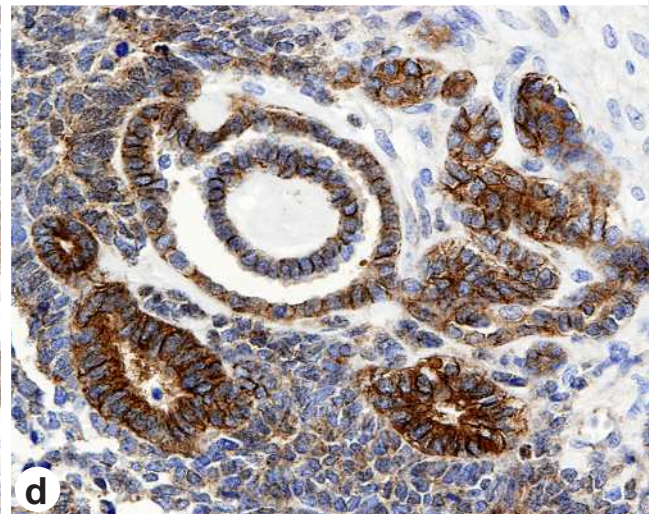
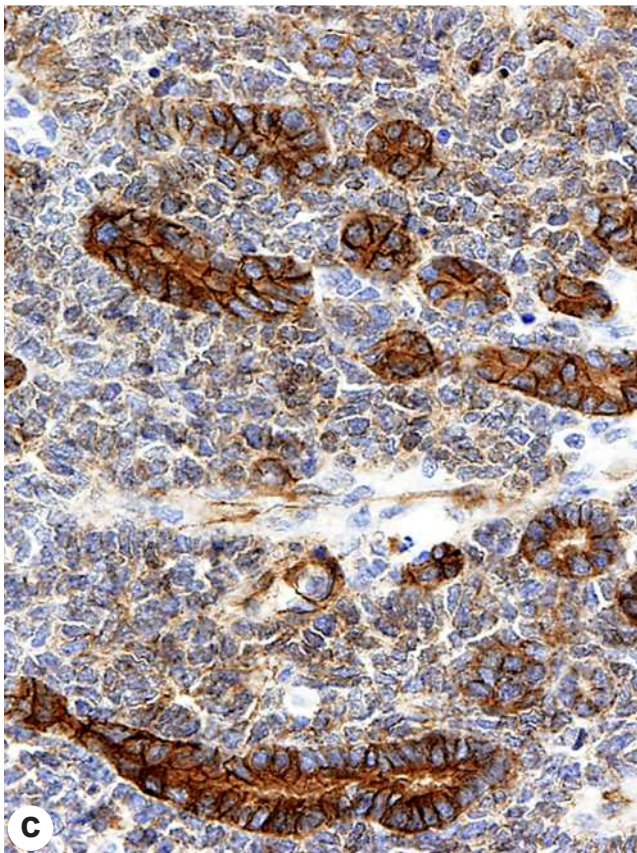
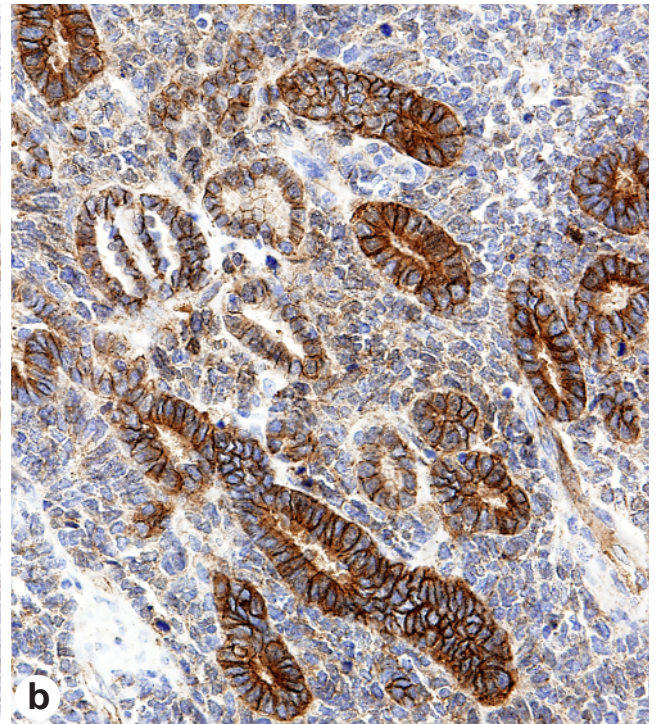
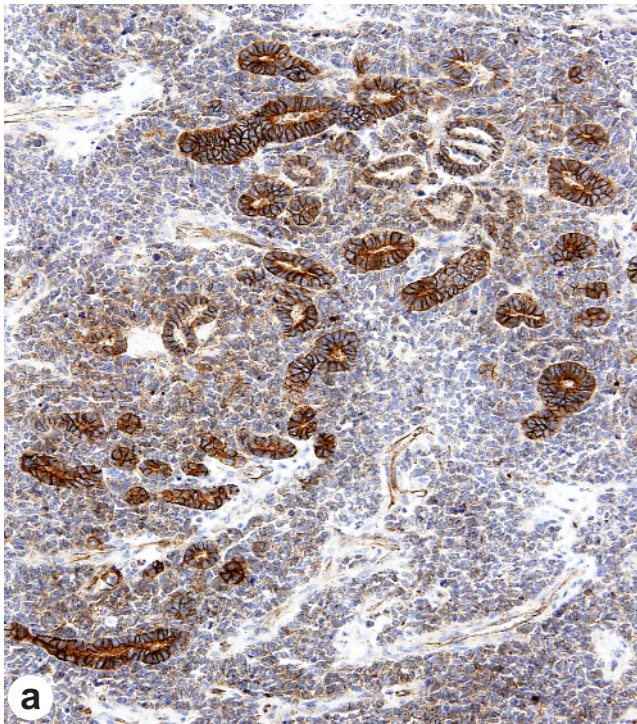




***Fig. 37. Expresión de beta-catenina en el nefroblastoma***

- a) En esta fotomicrografía se pueden apreciar elementos epiteliales, estos están representados por túbulos serpiginosos rodeados por blastema, el cual ha sido negativo para el inmunomarcaje; por el contrario, el epitelio es potentemente positivo y las membranas celulares son fuertemente delineadas. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 20X.
- b) Gran aumento del caso anterior; se perciben mejor las características de este nefroblastoma, el blastema primitivo que rodea las estructuras epiteliales tubulares es negativo y los epitelios han resultado positivos mostrando potente positividad intracitoplasmica y membranosa. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- c) Fotomicrografía que exhibe un campo con elementos epiteliales y blastematosos, nótese que aunque el túbulo exhibe potente positividad esta es focalizada. El blastema mostrado en el fondo de la imagen exhibe actividad mitótica y nula reactividad para el inmunomarcaje. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- d) La imagen mostrada presenta un nefroblastoma bifásico con presencia de elementos blastematosos y epiteliales complejos y de apariencia madura, estos últimos son fuertemente positivos en las regiones citoplásmica y membranosa; obsérvese además que algunas células blastemales exhiben leve positividad focalizada. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- e) En esta imagen pueden encontrarse los tres elementos de un nefroblastoma, nótese que solamente los túbulos y no la estructura glomeruloide aquí mostrada son positivos en la membrana; además, los escasos componentes estromales y blastemales son negativos para el inmunomarcaje. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.



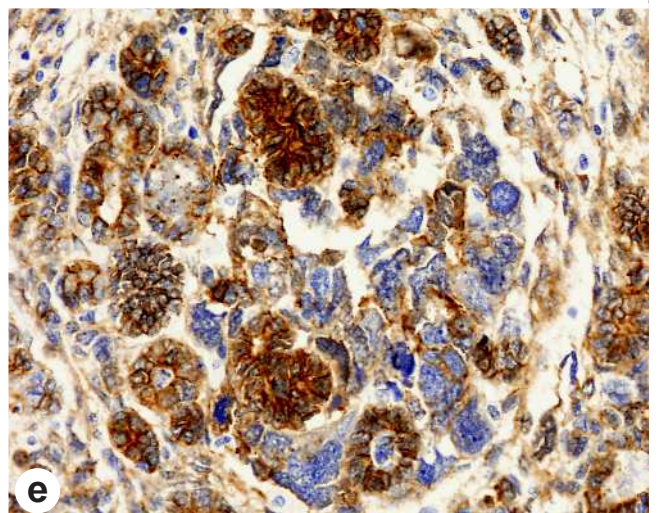
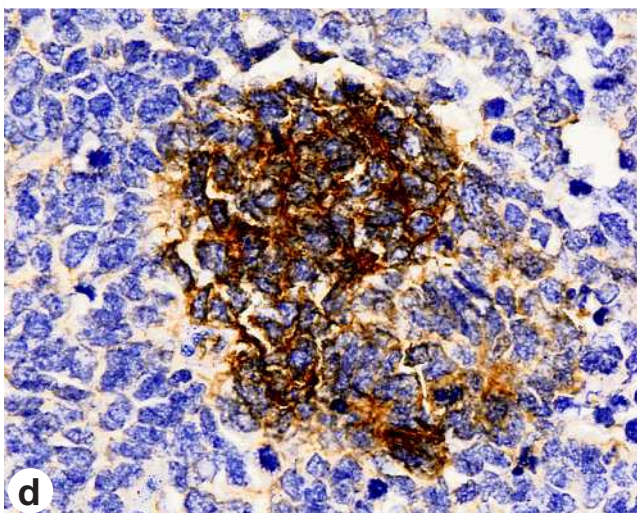
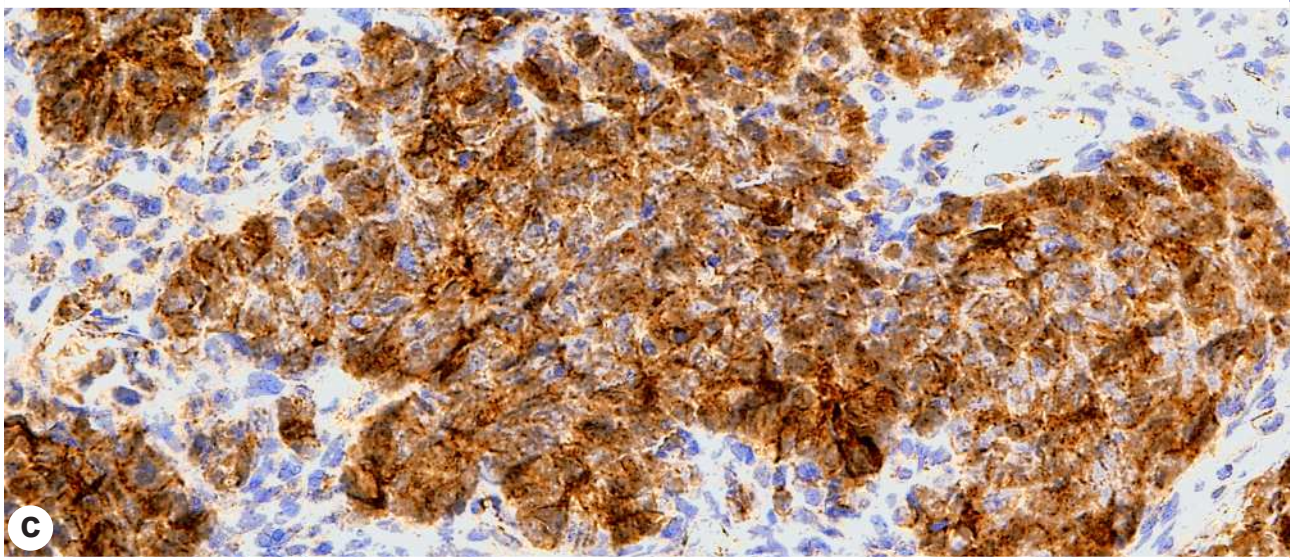
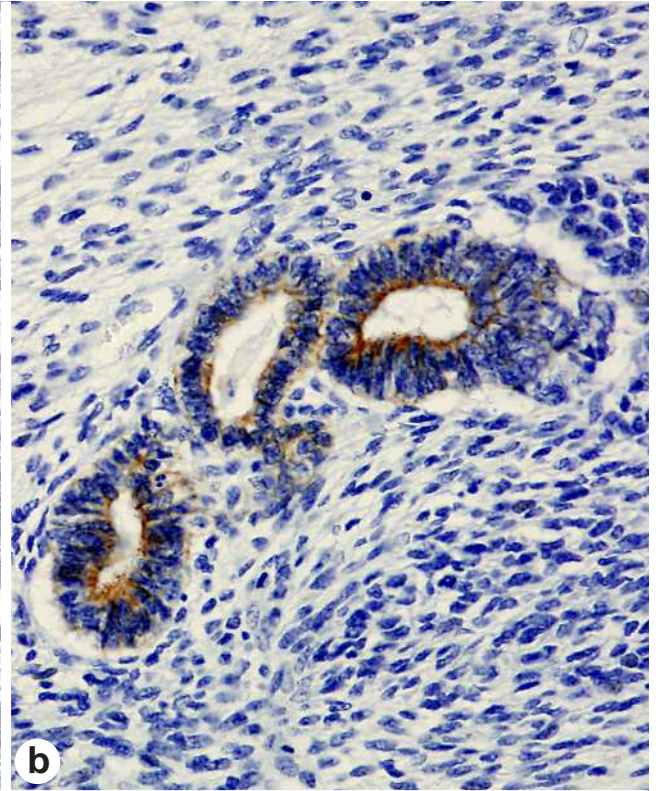
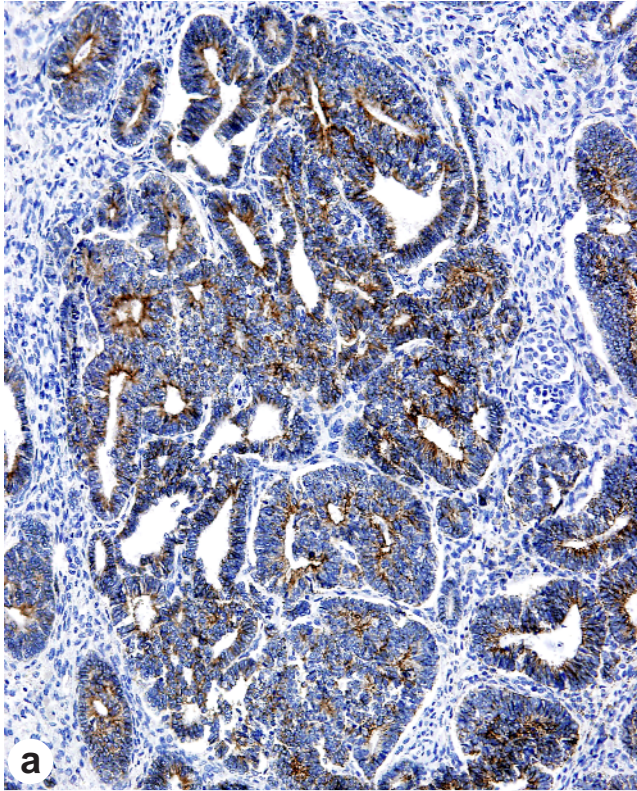




***Fig. 38. Expresión de beta-catenina en el nefroblastoma***

- a) Grupo compacto de estructuras tubulares complejas con patrón de espalda con espalda seccionados transversalmente. Nótese la intensa positividad membranosa para la proteína con localización apical. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- b) En esta imagen a gran aumento se identifican un túbulo tortuoso seccionado oblicuamente que es moderadamente positivo en la región apical de la membrana citoplásmica, mientras que el estroma inmaduro circunvecino es completamente negativo. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- c) La imagen exhibe una zona con un islote irregular constituido por elementos blastemales inmaduros, se observa potente positividad intracitoplásmica con grumos gruesos de la proteína, la positividad es tan intensa que dificultan ver las características nucleares de estas células. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- d) Una sábana de elementos blastemales mitóticamente activa se observa en esta imagen, aunque la positividad es potente, se ha focalizado a un solo nódulo blastemal. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- e) La fotomicrografía muestra un nefroblastoma de histología desfavorable con evidente nucleomegalia; nótese como los elementos epiteliales no anaplásicos son positivos con intensidad variable para el inmunomarcaje en la región intracitoplasmica y sobre las membranas celulares; el blastema anaplásico es claramente negativo para el epítipo beta-catenina. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.



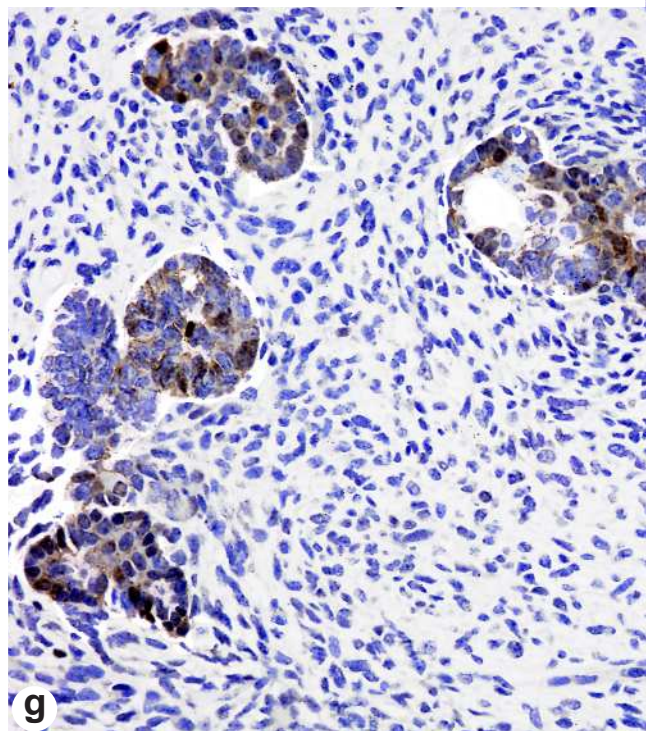
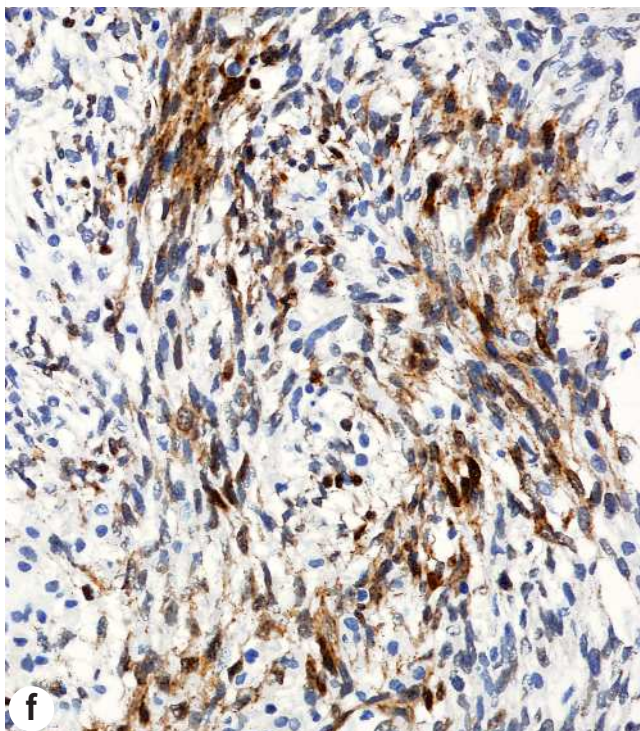
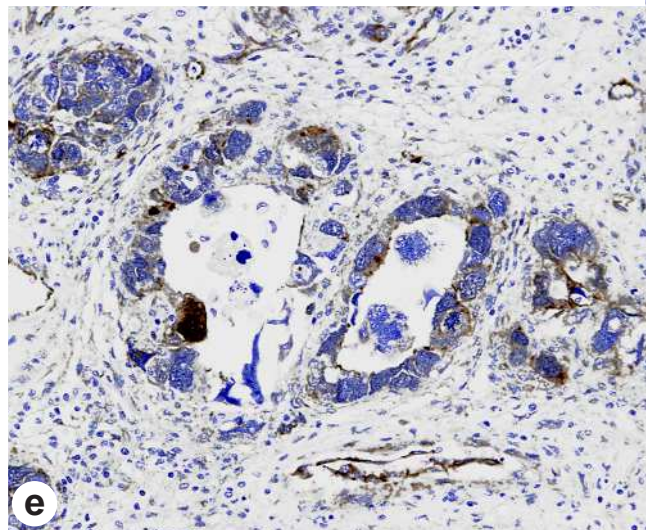
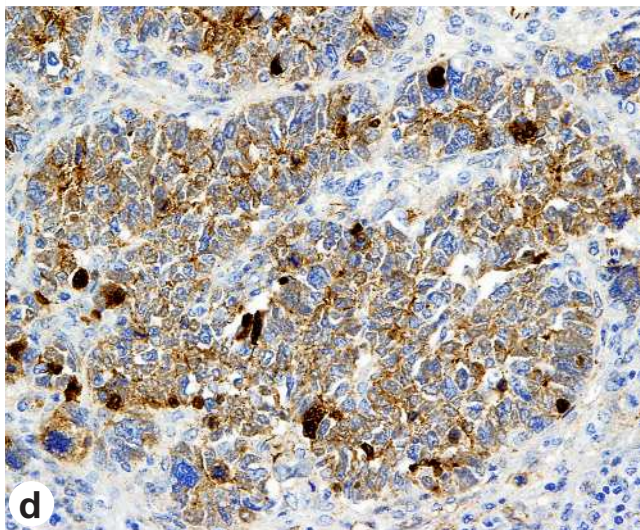
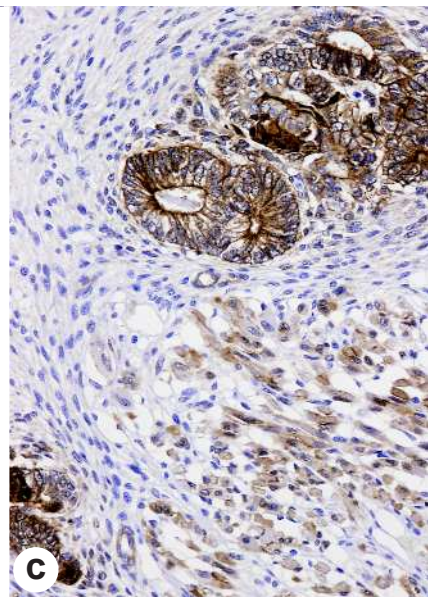
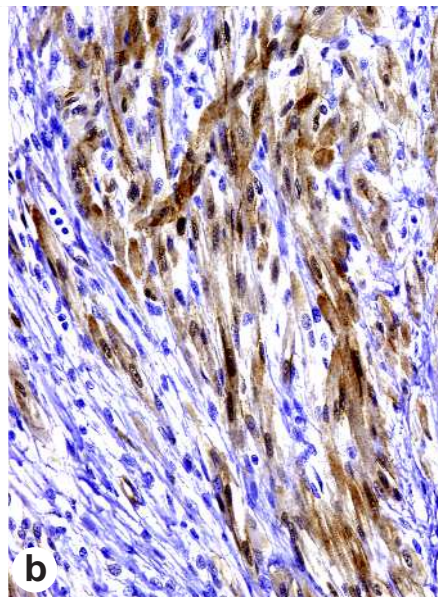
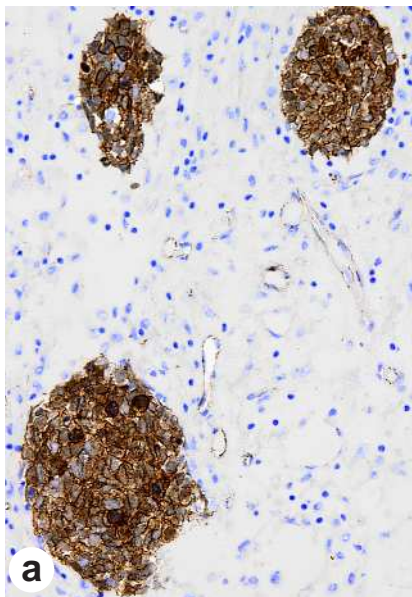




***Fig. 39. Expresión de beta-catenina en el nefroblastoma***

- a)** Se observan tres islotes blastemales rodeados por estroma fibroso con potente positividad citoplásmica y también membranosa; nótese además la leve positividad con inmunolocalización nuclear de expresión focal. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- b)** Zona de predominio estromal con tendencia a la citodiferenciación de elementos heterólogos, se identifican haces irregulares de células rabdomioblásticas que viajan en distintas direcciones mostrando positividad intracitoplásmica finamente granular y moderada intensidad nuclear. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- c)** Fotomicrografía que muestra un grupo de túbulos simples “en colisión” seccionados transversalmente, se identifica positividad membranosa en la esquina superior derecha, e inmunolocalización nuclear en las células de la esquina inferior izquierda. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- d)** Nefroblastoma de histología desfavorable. El festón blastemal anaplásico aquí mostrado exhibe expresión nuclear potente focalizada. Obsérvese que la proteína se ha expresado también débilmente dentro del citoplasma, el escaso estroma observado resultó negativo al inmunomarcaje. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- e)** Fotomicrografía del caso anterior que muestra la parte epitelial de este nefroblastoma de histología desfavorable. La imagen demuestra túbulos primitivos con macromegalia y mitosis multipolares; se identifica positividad nuclear focalizada. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- f)** Remolinos de células estromales indiferenciadas caracterizan a este ejemplo de nefroblastoma de predominio estromal, la positividad nuclear para el epítipo beta-catenina es de distribución irregular, además se aprecia débil expresión citoplásmica. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.
- g)** Nótese que la positividad nuclear se circunscribe a las células epiteliales aquí mostradas, la intensidad es variable y la distribución de la expresión de la proteína es irregular. El estroma circundante es negativo. Anti- beta-catenina-Hematoxilina. 40X.



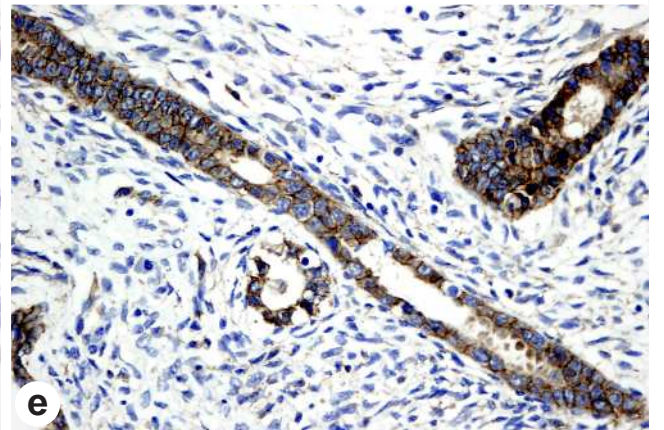
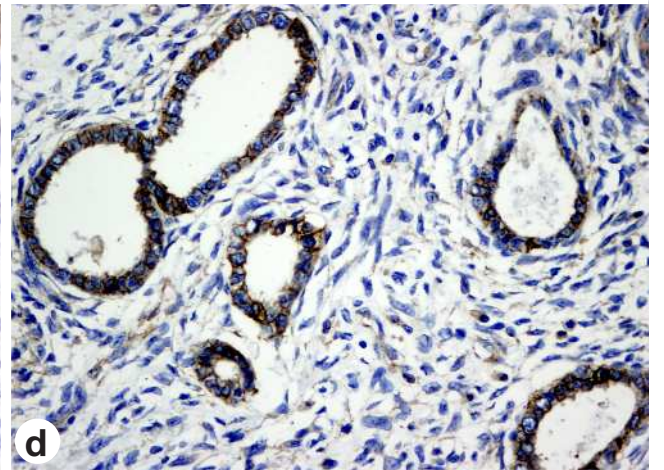
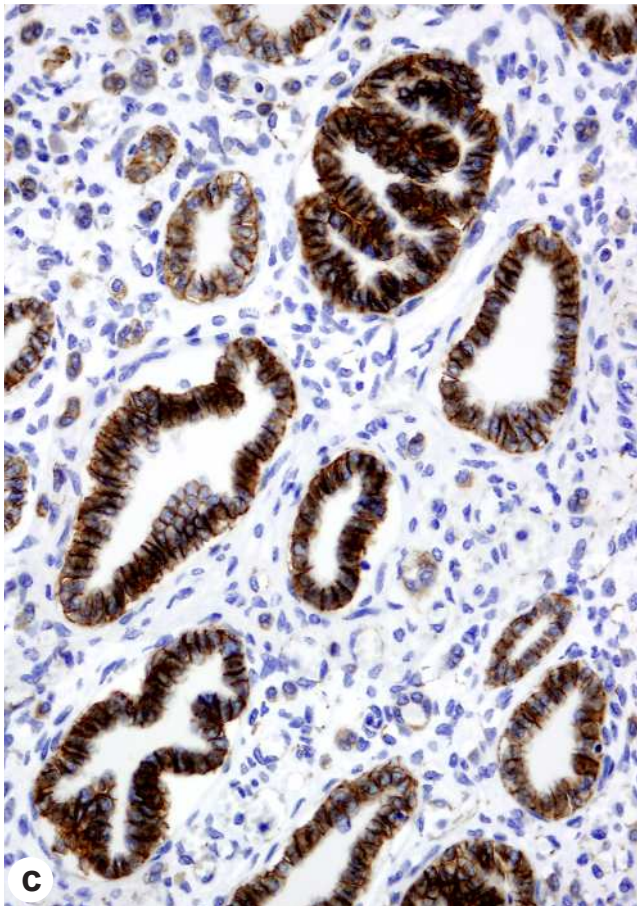
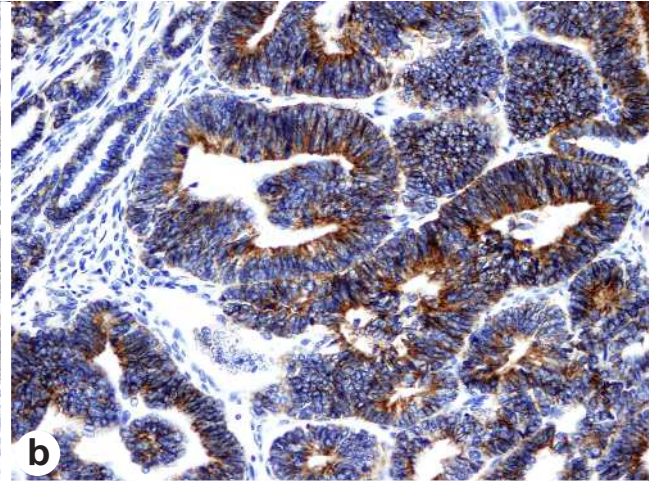
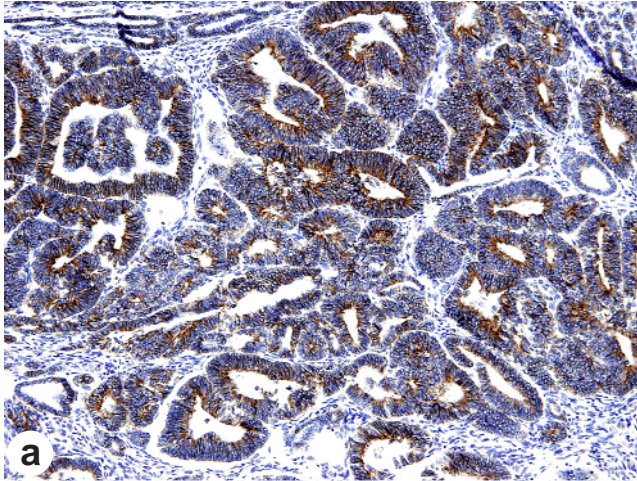




***Fig. 40. Expresión de p120 en el nefroblastoma***

- a) La imagen exhibe la zona epitelial de un nefroblastoma donde los túbulos neoplásicos complejos presentan positividad discontinua con moderada intensidad membranosa. Anti-p120-Hematoxilina. 20X.
- b) Gran aumento del caso anterior. Los túbulos seccionados transversalmente y de apariencia madura aquí mostrados son fuertemente positivos, mientras que los seccionados longitudinalmente (esquina superior izquierda) poseen nula reactividad. Anti- p120-Hematoxilina. 40X.
- c) Se identifican túbulos tortuosos de riñón no neoplásico con potente positividad intracitoplásmica y membranosa, la proteína se ha expresada de manera difusa y exhibe nula reactividad en el intersticio. Anti- p120-Hematoxilina. 40X.
- d) El componente estromal de este ejemplo de nefroblastoma muestra nula reactividad, mientras que el epitelio es moderadamente positivo en la membrana y dentro del citoplasma. Anti- p120-Hematoxilina. 40X.
- e) La imagen muestra secciones longitudinales de túbulos simples con trayecto rectilíneo, revestidos por una sola capa de células cúbicas que han resultado positivas con moderada intensidad, la positividad membranosa es lineal y granular dentro del citoplasma. Anti-p120-Hematoxilina. 40X.

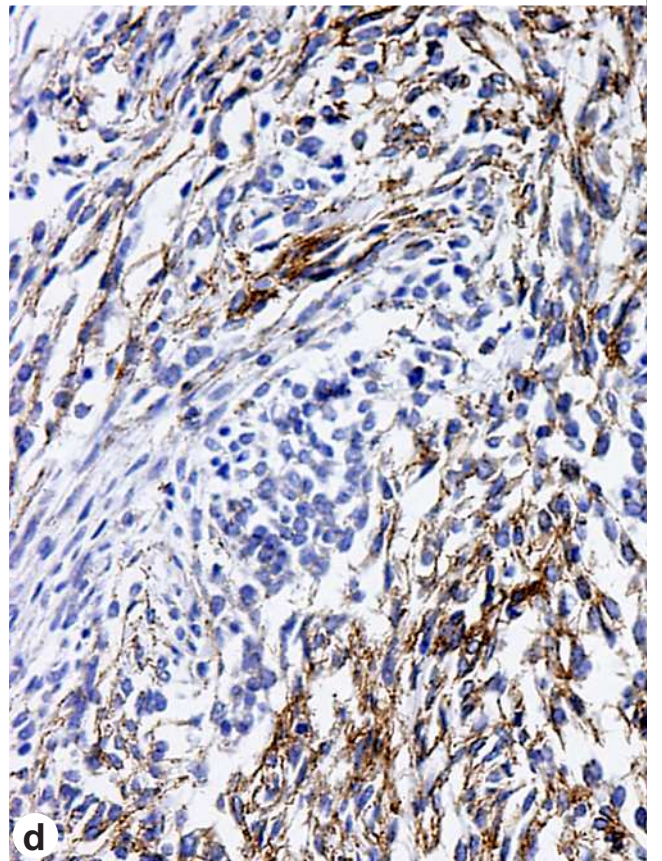
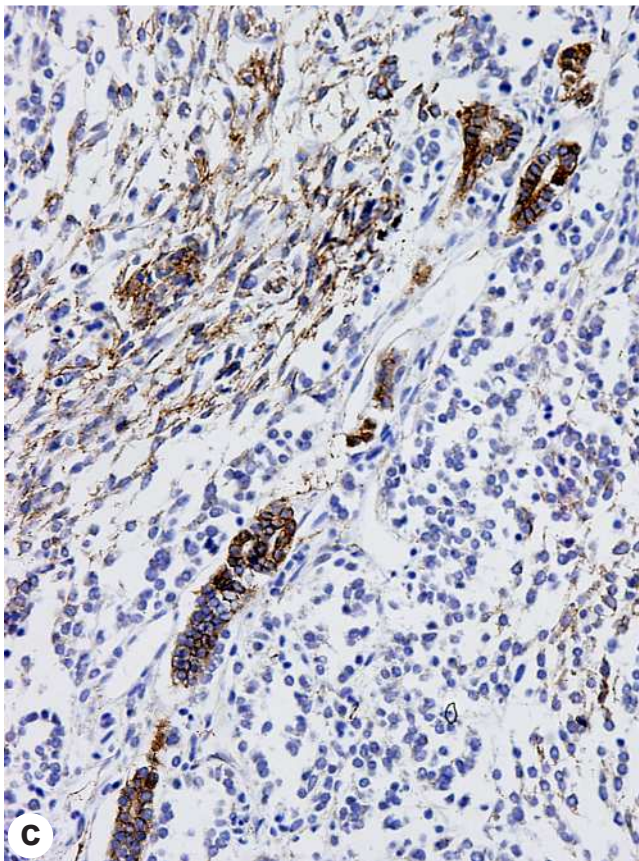
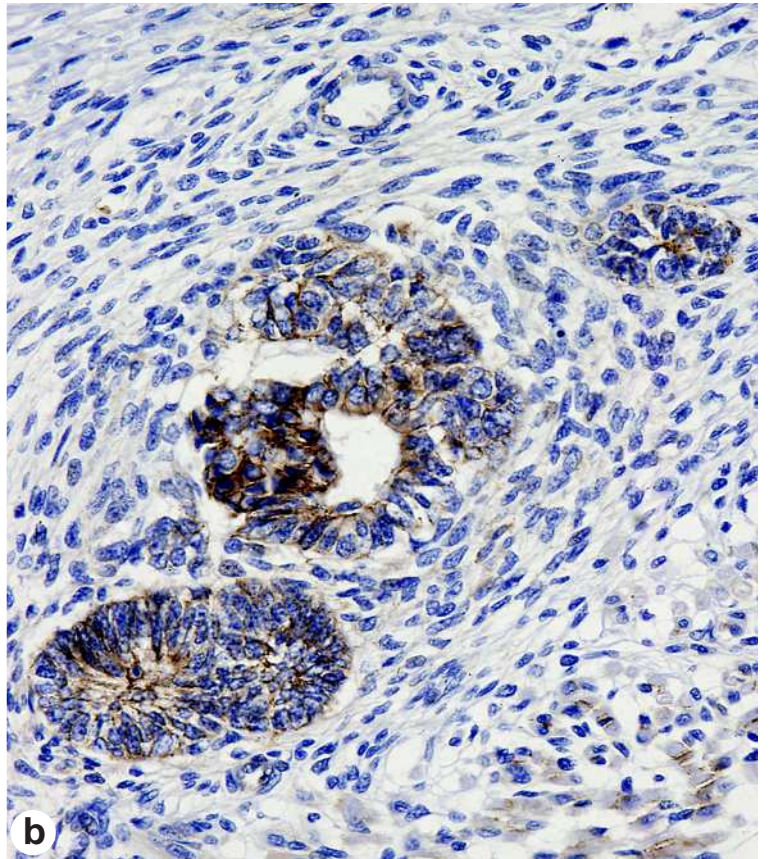
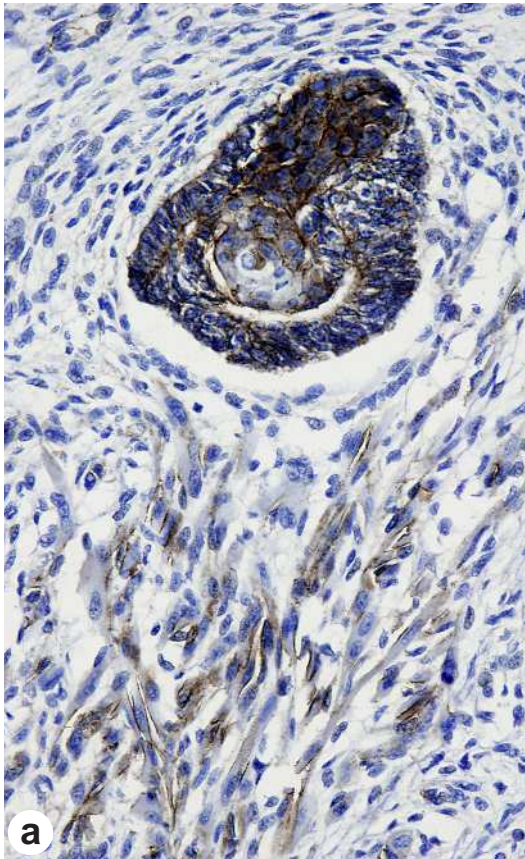




***Fig. 41. Expresión de p120 en el nefroblastoma***

- a)** Estructura glomeruloide correspondiente a patrón epitelial de nefroblastoma, se observa expresión membranosa moderada de la proteína, el citoplasma exhibe leve positividad. Nótese que el estroma apenas expresa el epítotope p120 y lo hace en forma de finos gránulos. Anti- p120-Hematoxilina. 40X.
- b)** En este ejemplo de nefroblastoma bifásico se identifican elementos epiteliales con expresión granular citoplásmica y membranosa con intensidad y expresión variable. El estroma vecino es completamente negativo. Anti- p120-Hematoxilina. 40X.
- c)** Los túbulos y el componente estromal de esta imagen presentan positividad citoplásmica moderada; en la esquina inferior derecha se muestra la parte blastemal de este ejemplo de nefroblastoma clásico, la cual presenta trazas de positividad para la proteína. Anti- p120-Hematoxilina. 40X.
- d)** La figura muestra otro campo del caso anterior donde predominan los elementos estromales, estos forman haces irregularmente dispuestos y presentan positividad citoplásmica en grumos toscos. Anti- p120-Hematoxilina. 40X.



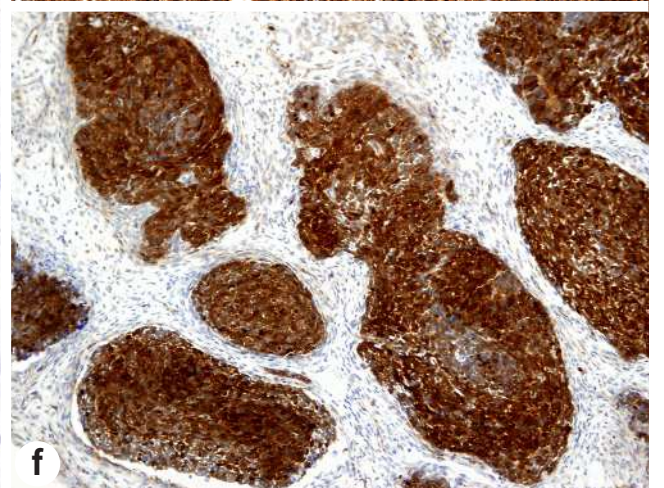
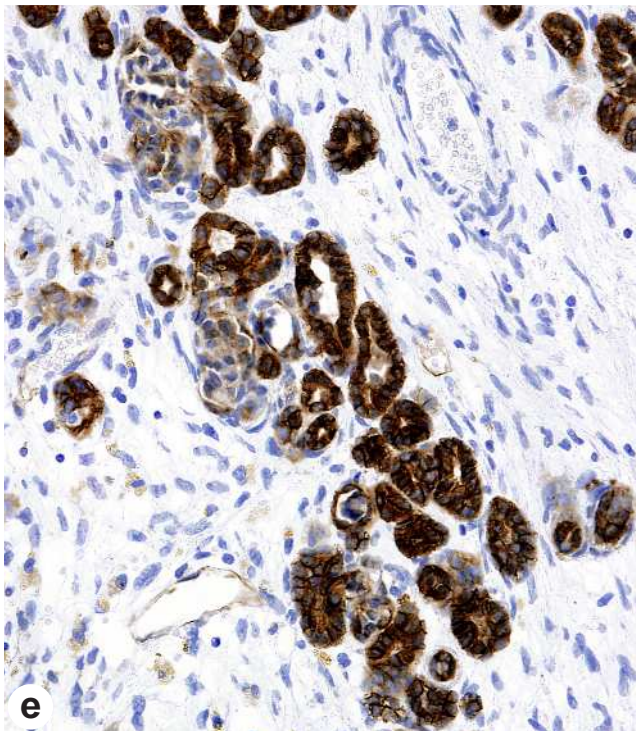
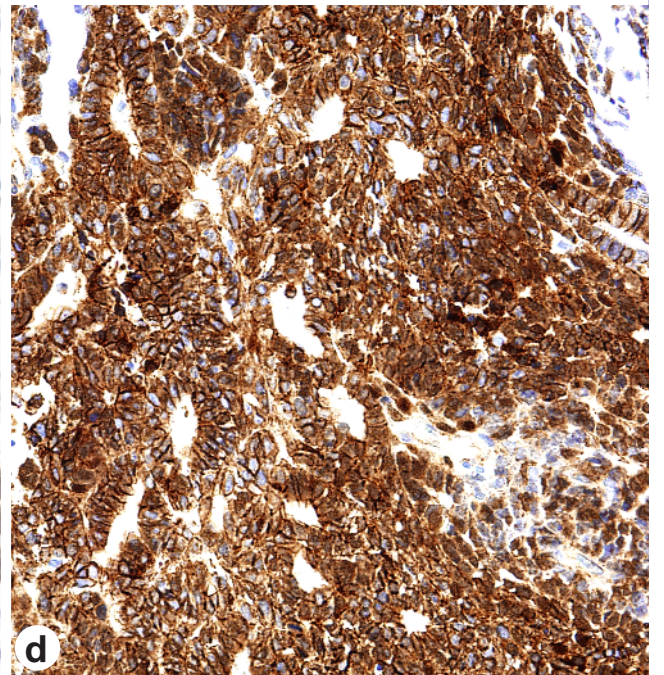
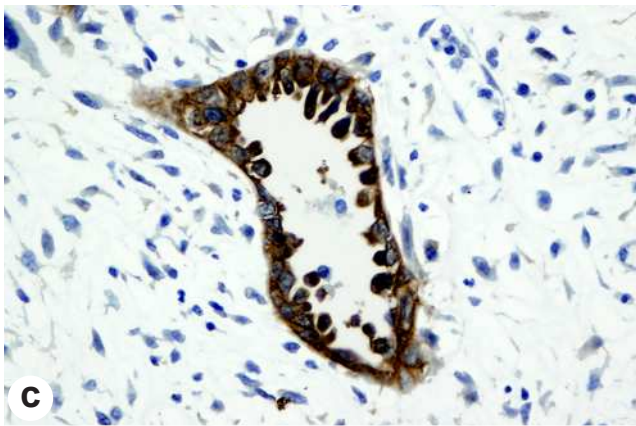
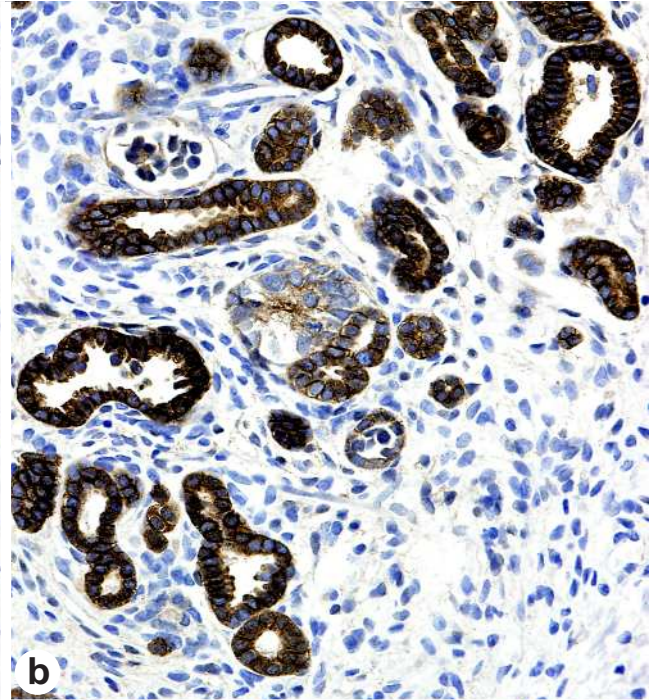
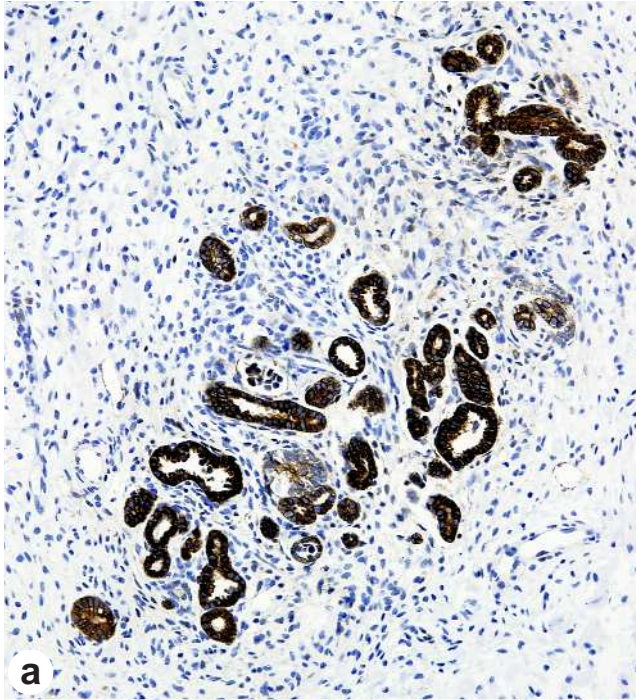




***Fig. 42. Expresión de gamma-catenina en el nefroblastoma***

- a) Vista panorámica de un nefroblastoma bifásico, tanto los túbulos como las estructuras glomeruloides, que representan a los elementos epiteliales de esta imagen, son positivos en la membrana, además, se observa positividad débil en el citoplasma. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 20X.
- b) Imagen a mayor aumento de la figura anterior. Destaca la potente positividad de distribución uniforme para el epítipo gamma-catenina que dibuja perfectamente la membrana celular de las células epiteliales aquí observadas, el estroma vecino es completamente negativo. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 40X.
- c) Las células epiteliales de este túbulo seccionado de manera oblicua muestran “decapitación”, son débilmente positivas en la membrana, y presentan moderada inmunoreacción en el citoplasma. Nótese además que el estroma es negativo. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 40X.
- d) La imagen aquí presentada muestra elementos blastemales y epiteliales con potente positividad de distribución homogénea y difusa que resalta perfectamente ambos componentes y los diferencia del patrón estromal; la positividad citoplásmica es más intensa en las células blastematosas. Nótese también que algunas células blastematosas exhiben fuerte positividad nuclear. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 40X.
- e) Esta fotomicrografía exhibe un grupo de túbulos seccionados oblicuamente, las células neoplásicas que revisten los túbulos muestran potente positividad membranosa e intracitoplásmica. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 40X.
- f) Imagen que muestra los típicos festones blastemales, resaltando la intensa positividad citoplásmica de las células; nótese como los dibuja perfectamente y los separa del estroma, el cual es completamente negativo. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 20X.



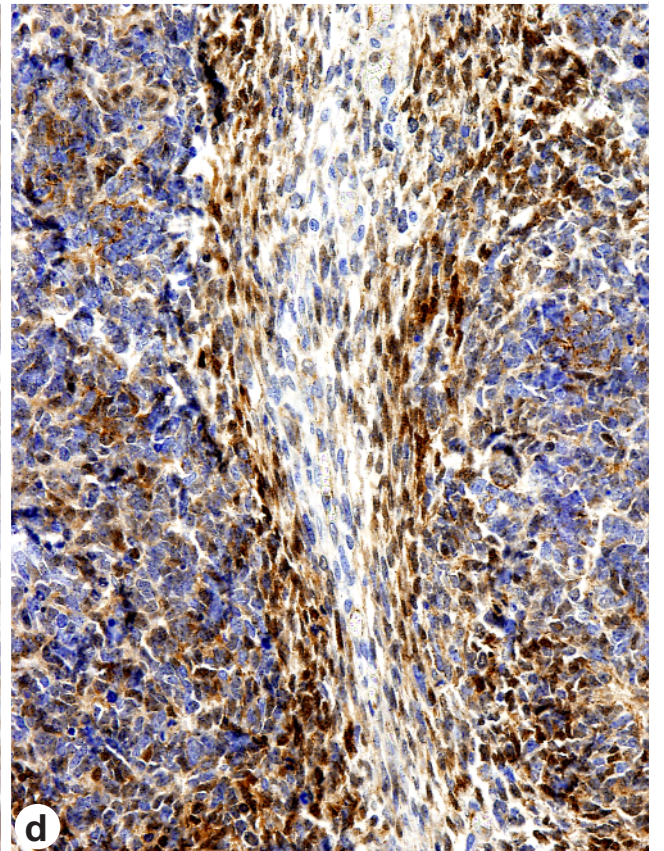
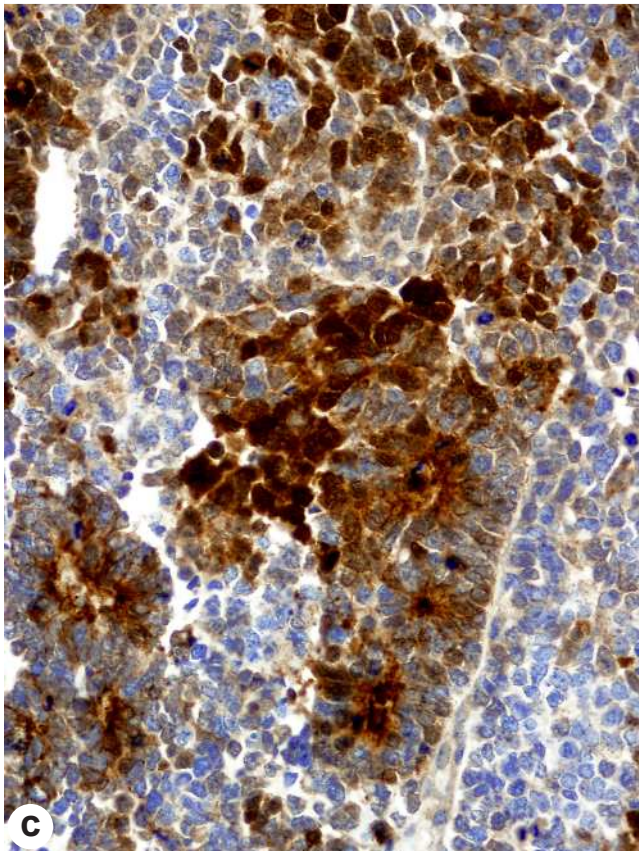
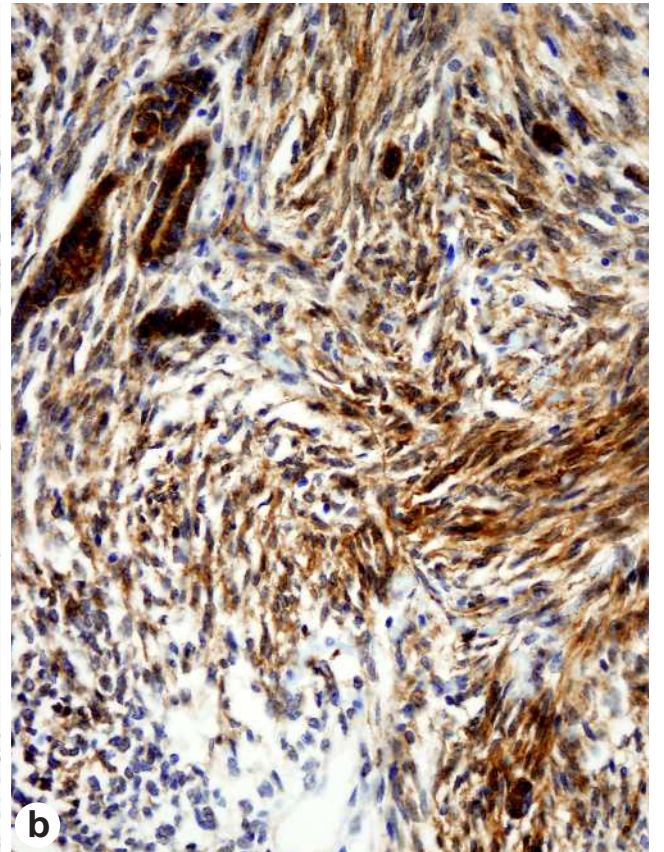
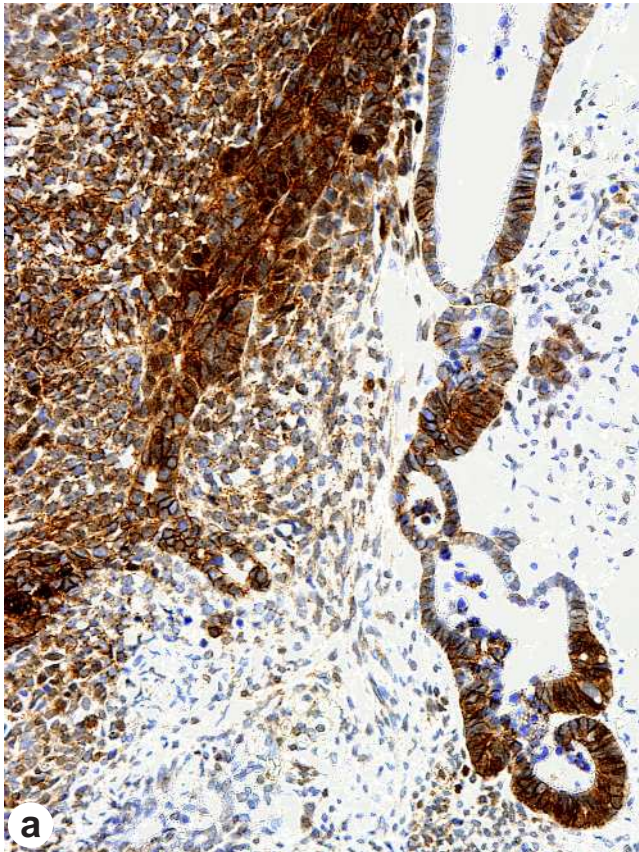




***Fig. 43. Expresión de gamma-catenina en el nefroblastoma***

- a)** Nefroblastoma clásico que exhibe los tres componentes celulares, el túbulo tortuoso y el islote blastemal son positivos, mientras que el escaso tejido estromal es negativo al inmunomarcaje, obsérvese como la positividad muestra grumos toscos. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 40X.
- b)** En este nefroblastoma de predominio estromal, se identifica moderada intensidad del inmunomarcaje para el epítipo gamma-catenina con finos grumos de la proteína dentro del citoplasma, el componente epitelial también muestra positividad pero de manera intensa. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 40X.
- c)** Resalta la positividad nuclear focalizada en el patrón blastemal, los epitelios son moderadamente positivos en la zona intracitoplasmica. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 40X.
- d)** Nótese como la positividad citoplasmica en el componente estromal de esta imagen separa perfectamente los nódulos blastematosos, estos últimos apenas exhiben inmunomarcaje intracitoplasmático, y algunas de ellas exhiben inmunolocalización nuclear. Anti- gamma-catenina-Hematoxilina. 40X.



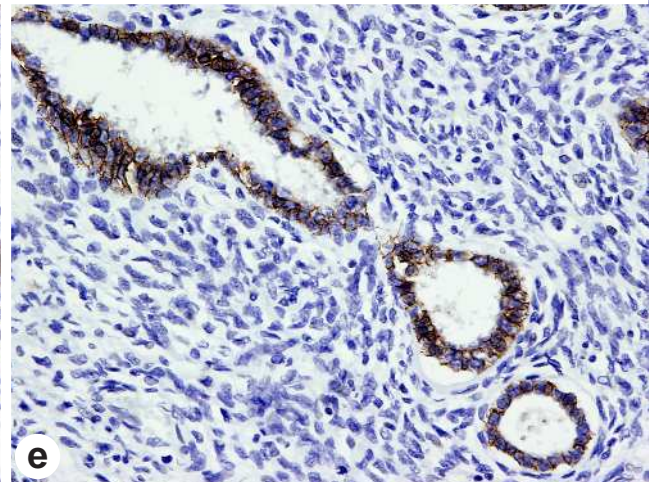
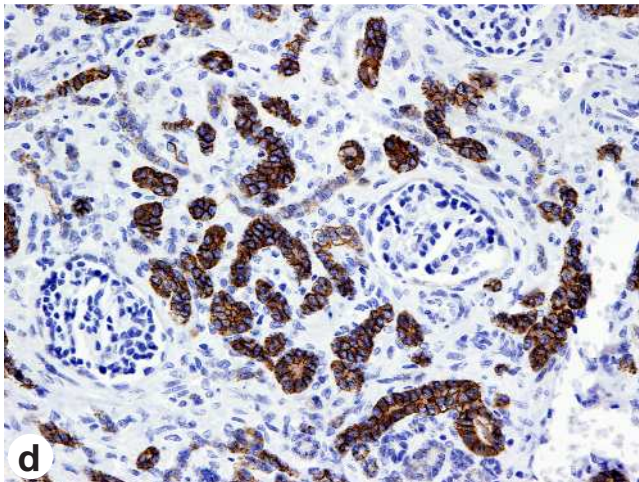
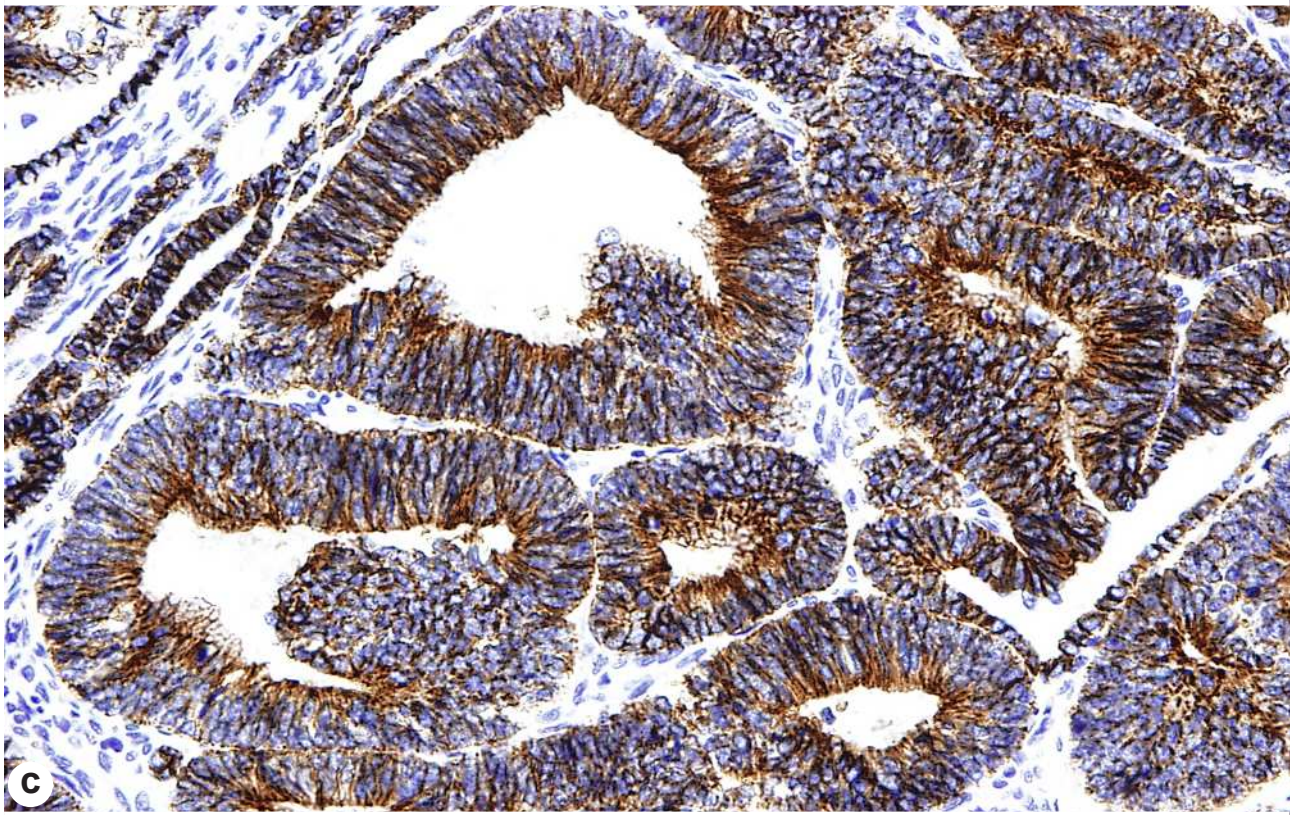
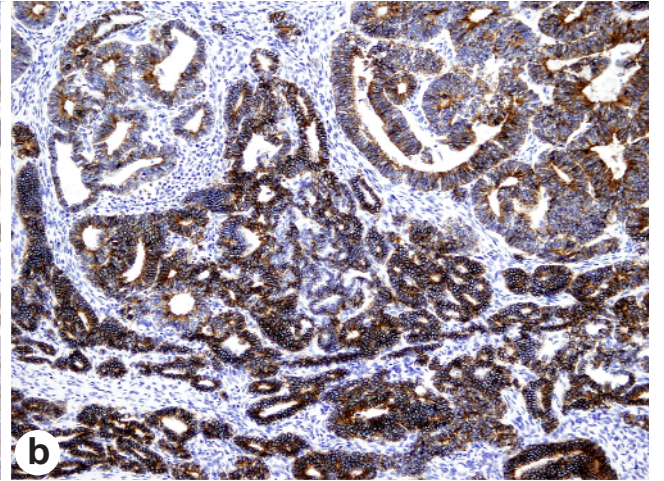
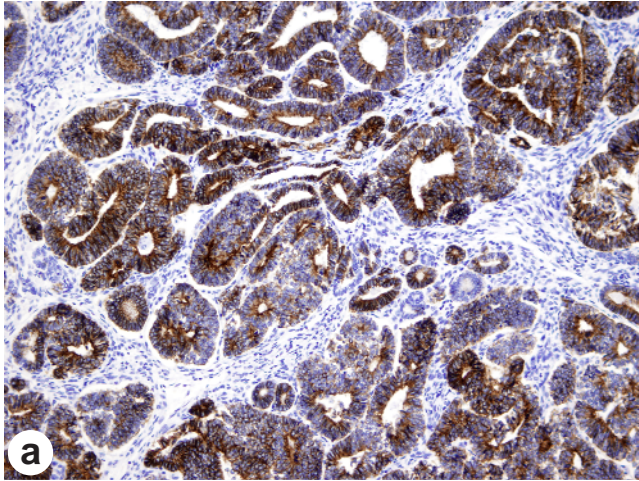




***Fig. 44. Expresión de cadherina-E en el nefroblastoma***

- a)** Las secciones transversales y oblicuas de los túbulos neoplásicos de esta figura muestran positividad membranosa muy evidente de predominio apical, el estroma exhibe nula reactividad para la proteína. Anti- cadherina-E-Hematoxilina. 20X.
- b)** Imagen panorámica de un nefroblastoma de predominio epitelial, la fotomicrografía muestra positividad en las células cilíndricas que revisten las estructuras pseudoglandulares; el componente estromal es negativo para el inmunomarcaje del epítipo cadherina-E. Anti-cadherina-E-Hematoxilina. 20X.
- c)** En esta figura a gran aumento se puede observar potente positividad para el inmunomarcaje en el epitelio cilíndrico, la inmunoreactividad es más manifiesta en la porción apical de las células; sin embargo, las membranas celulares laterales también exhiben inmunoreactividad. Anti- cadherina-E-Hematoxilina. 40X.
- d)** Nótese como exclusivamente los túbulos de este riñón no neoplásico son positivos para la proteína, los dos glomérulos de la imagen así como el intersticio incluyendo el escaso componente vascular son negativos. Anti- cadherina-E-Hematoxilina. 40X.
- e)** La figura presenta sección longitudinal de un túbulo de trayecto recto, las células epiteliales cilíndricas bajas son positivas para el epítipo cadherina-E dibujando el contorno de las membranas celulares; la porción estromal de la neoplasia es negativa. Anti- cadherina-E-Hematoxilina. 40X.



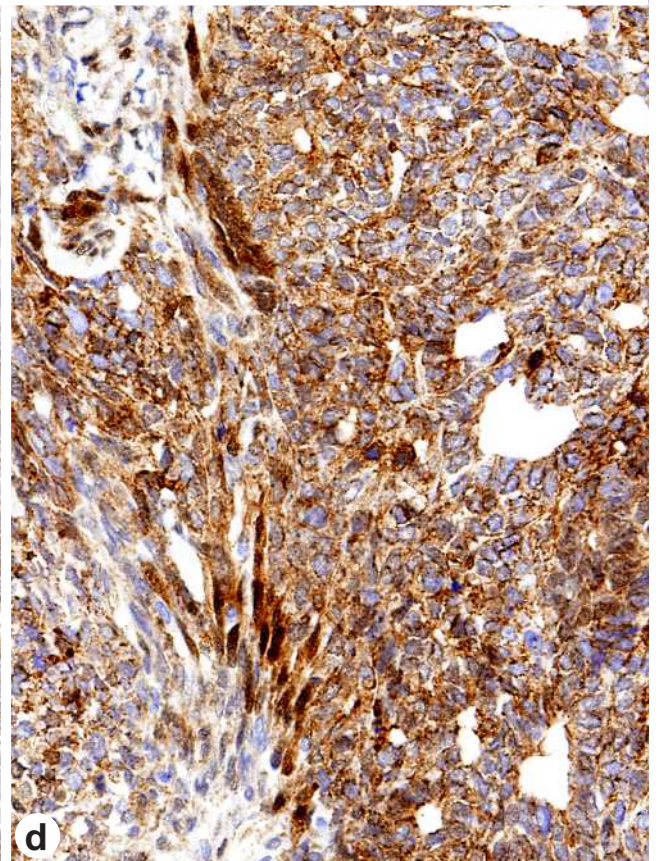
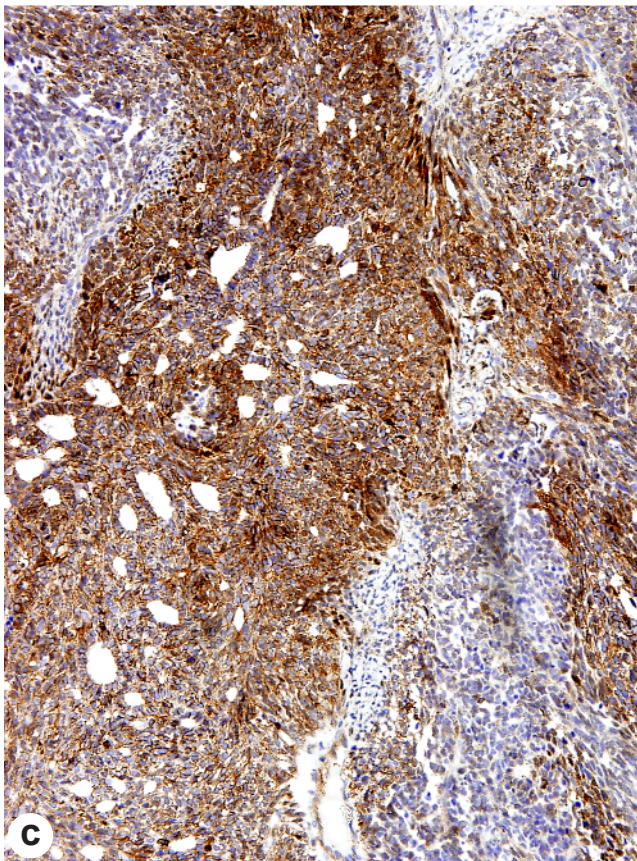
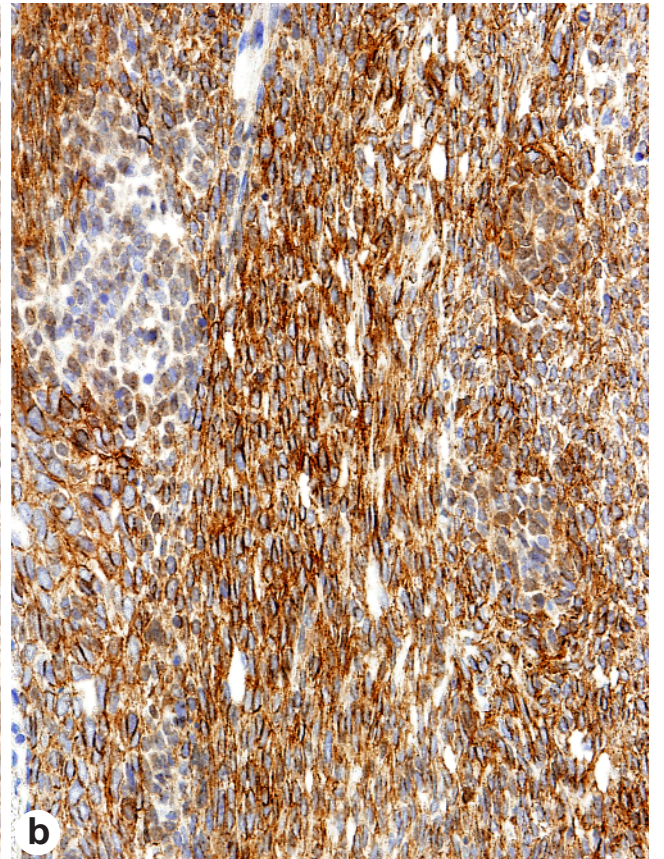
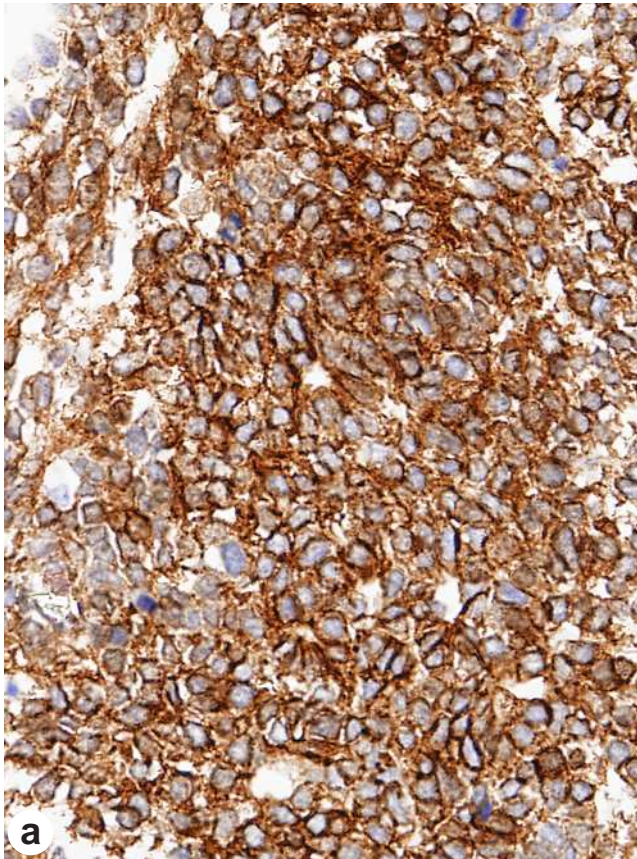




***Fig. 45. Expresión de cadherina-E en el nefroblastoma***

- a)** Clásica imagen de la parte blastemal de un nefroblastoma, las células forman una sábana de apariencia sincitial, la positividad para la proteína revela las membranas celulares del conglomerado celular, nótese como el estroma es casi inexistente. Anti-cadherina- E-Hematoxilina. 40X.
- b)** Las células alargadas e indiferenciadas aquí mostradas forman un haz en dirección vertical que representa la porción estromal de este nefroblastoma; el inmunomarcaje posee fuerte intensidad membranosa pero también citoplasmática; el poco componente blastemal observado es casi negativo. Anti- cadherina-E-Hematoxilina. 40X.
- c)** La figura exhibe un nefroblastoma trifásico, los epitelios y el estroma son positivos para la proteína y dibujan las membranas celulares, algunas células también resultaron positivas dentro del citoplasma. El blastema sólo exhibe trazas de positividad. Anti- cadherina-E-Hematoxilina. 40X.
- d)** Aunque la inmunoexpresión nuclear del epítipo cadherina-E es excepcional, obsérvese su expresión en la parte estromal en este ejemplo de nefroblastoma, el blastema exhibe positividad citoplasmica y membranosa. Anti- cadherina-E-Hematoxilina. 40X.

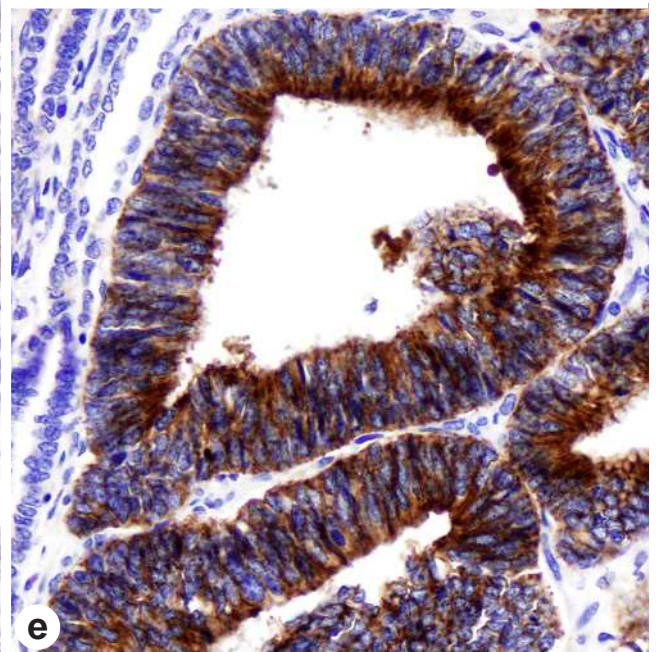
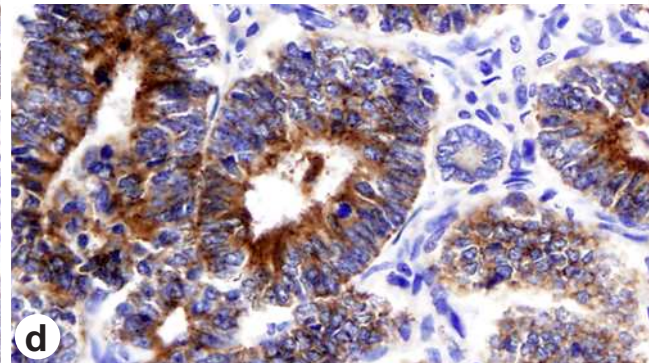
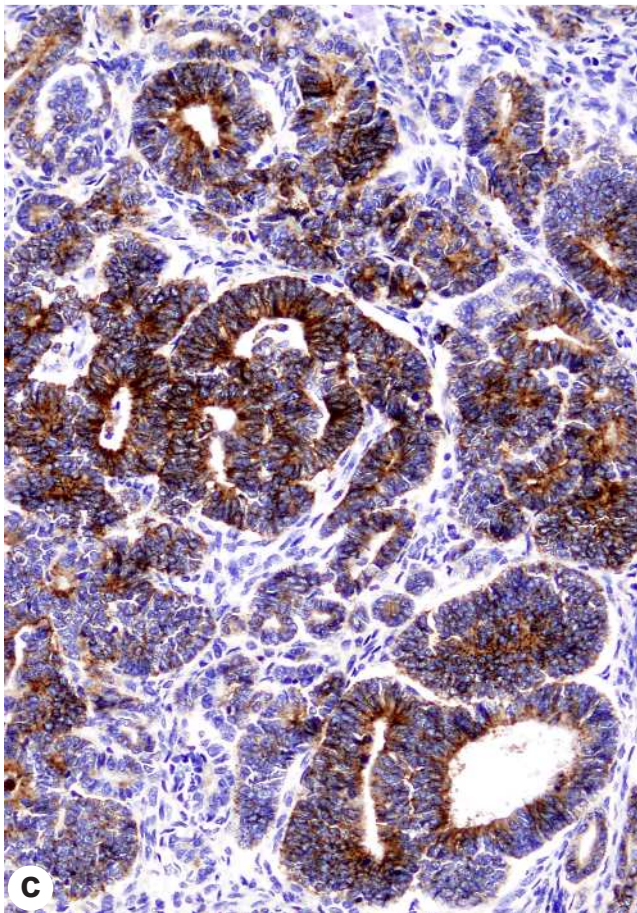
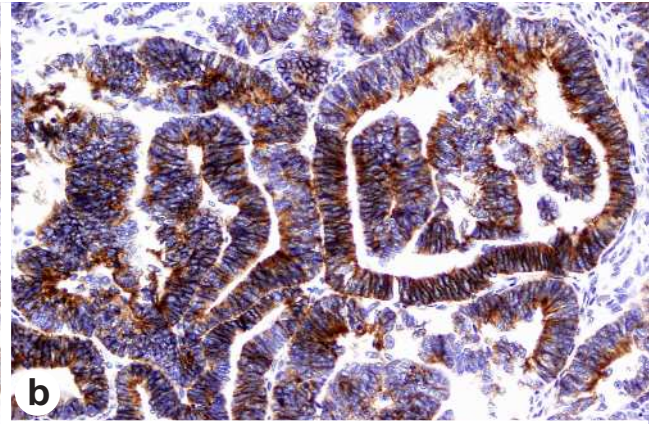
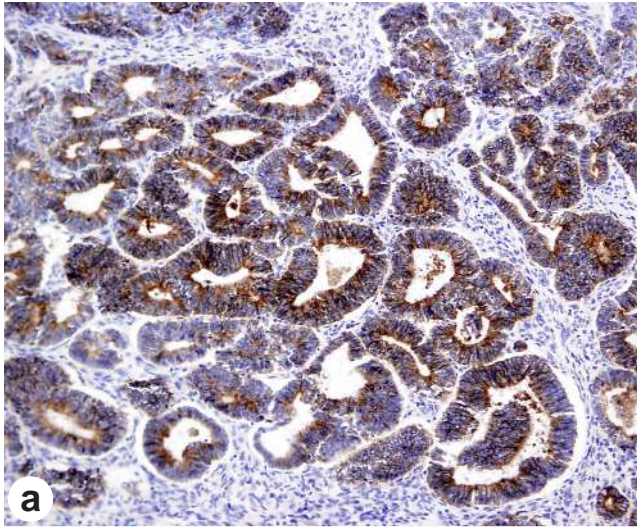






***Fig. 46. Expresión de Cadherina-P en el nefroblastoma***

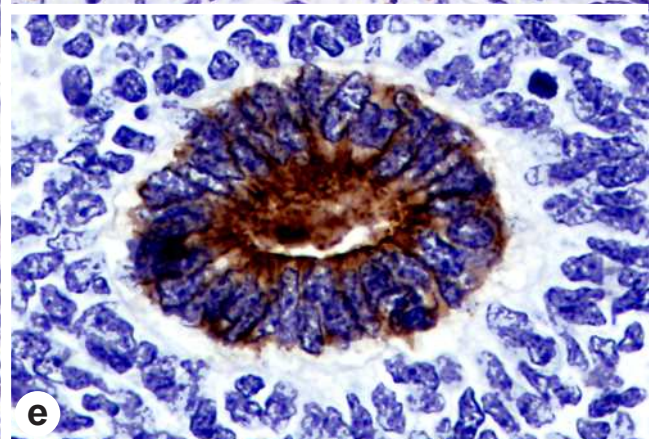
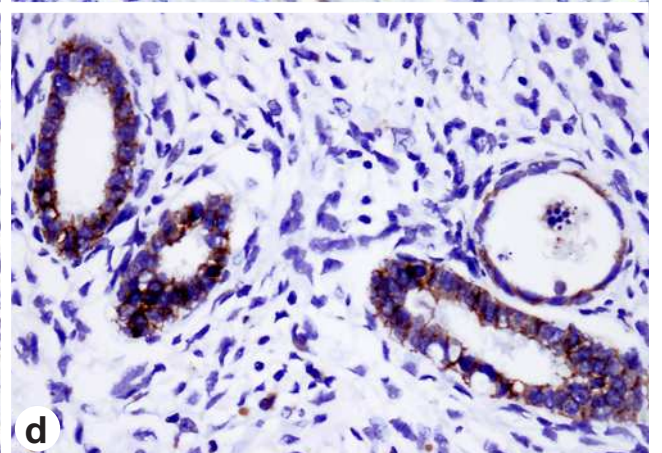
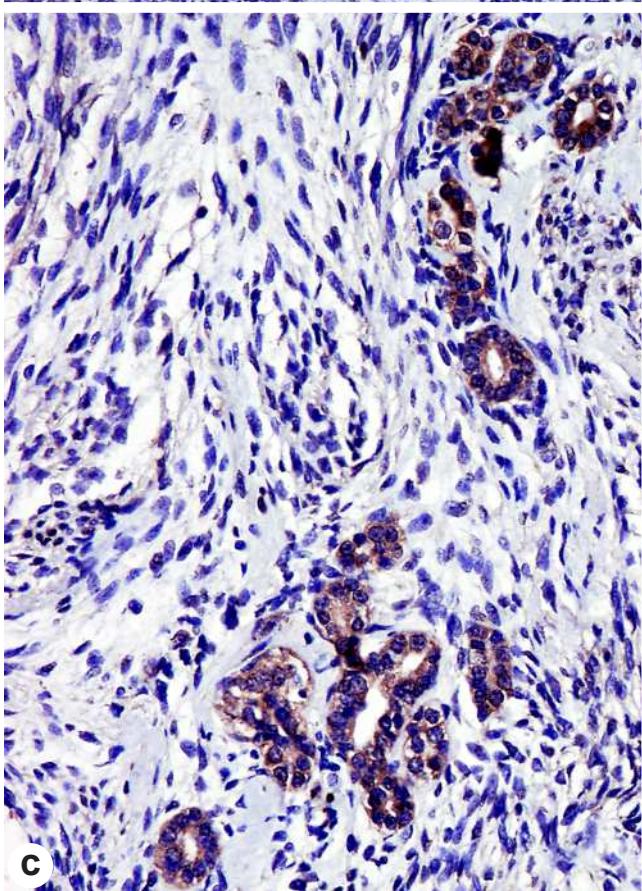
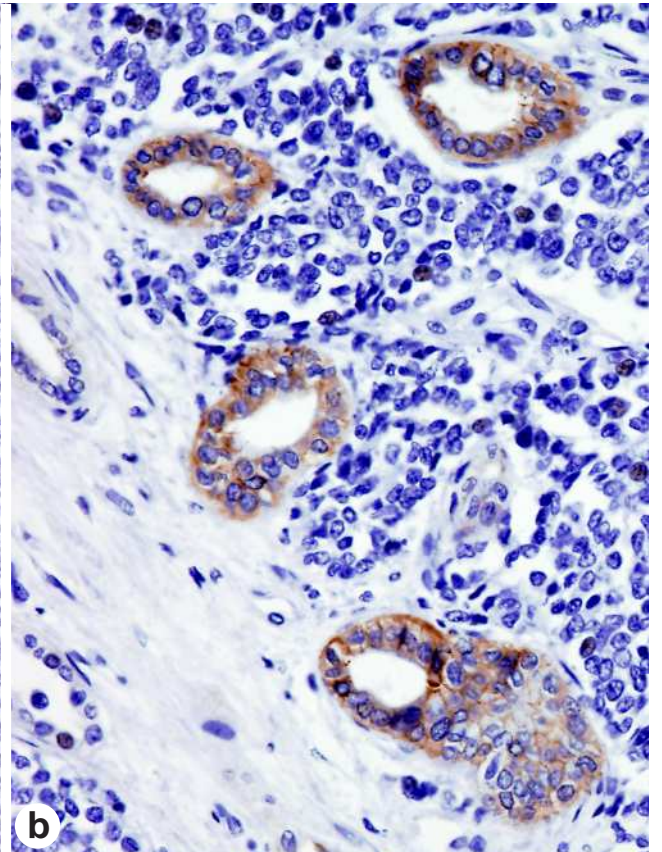
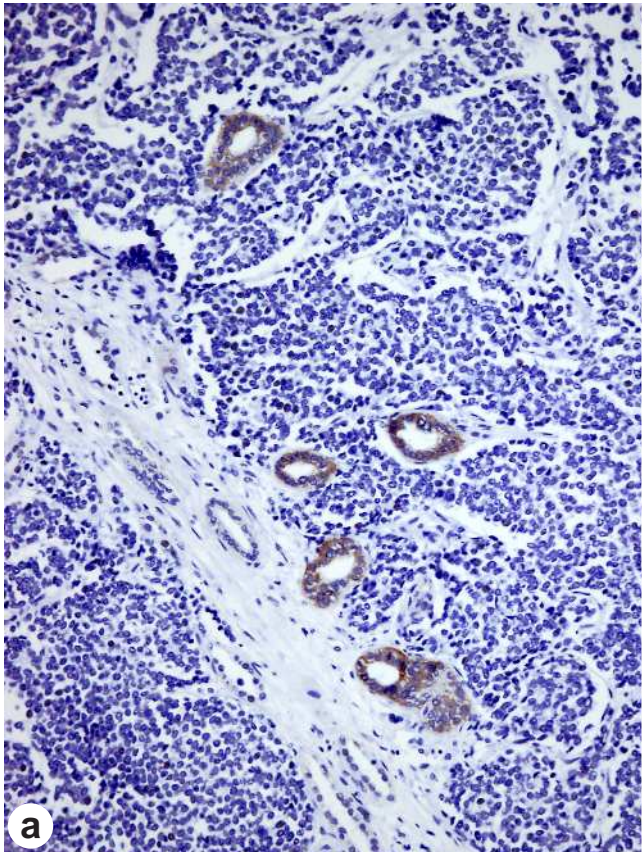
- a) La figura revela secciones transversales y oblicuas de estructuras tubulares de apariencia madura, éstas son complejas y están revestidas por una sola capa de epitelio cilíndrico, la positividad para la proteína es membranosa y es más evidente sobre la porción apical de la membrana celular. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 20X.
- b) En la imagen se aprecian túbulos irregulares y pseudopapilas apoyadas sobre escaso estroma fibrovascular; nótese como la inmunexpresión es continua y homogénea sobre la membrana celular. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 40X.
- c) Este componente epitelial complejo está revestido por células cilíndricas con núcleos ovoides orientados hacia la parte basal de las células, obsérvese como la proteína se expresa en la porción apical de las células tanto en el citoplasma como en la membrana celular; la porción inferior izquierda de la imagen exhibe leve positividad y el estroma vecino es negativo. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 40X.
- d) La fotomicrografía muestra secciones transversales que exhiben intensa positividad aleatoria y de distribución homogénea. Algunas células epiteliales exhiben nula reactividad para la proteína. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 40X.
- e) A gran aumento, se observan tres estructuras glandulares seccionadas transversalmente y revestidas por células cilíndricas cuyos núcleos tienen una apariencia de pseudoestratificación; nótese como la porción apical de la membrana y el citoplasma son intensamente positivos. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 40X.



***Fig. 47. Expresión de Cadherina-P en el nefroblastoma***

- a) Obsérvese como contrasta la negatividad del patrón blastemal difuso comparado con los pequeños túbulos cortados transversalmente aquí mostrados, aun cuando éstos apenas si expresan trazas del epítipo cadherina-P. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 20X.
- b) Fotomicrografía a gran aumento del caso anterior, los túbulos están formados por células cúbicas y exhiben muy leve positividad distribuida de manera regular dentro del citoplasma; en contraste, el blastema muestra nula reactividad para la proteína. Anti-cadherina-P-Hematoxilina. 40X.
- c) La figura muestra grupos de pequeños túbulos inmersos en abundante estroma de aspecto fibroblástico indiferenciado, las células neoplásicas epiteliales exhiben leve positividad membranosa focal y discretos grumos intracitoplásmicos. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 40X.
- d) A gran aumento el estroma que rodea este grupo de túbulos simples seccionados oblicuamente es completamente negativo, el epitelio tubular muestra moderada positividad membranosa. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 20X.
- e) En este campo a gran aumento se identifica un túbulo maduro, la positividad dibuja todo el contorno de la membrana celular pero más intensamente en la porción apical; también se observa discreta granularidad intracitoplásmica. Anti- cadherina-P-Hematoxilina. 40X.



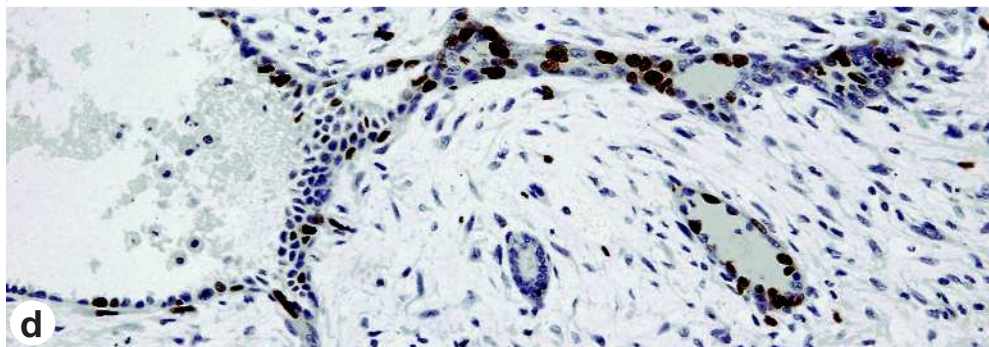
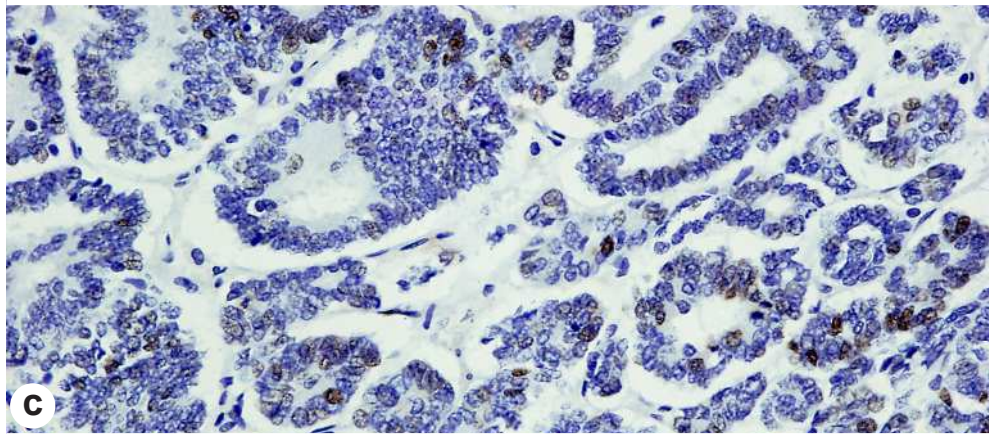
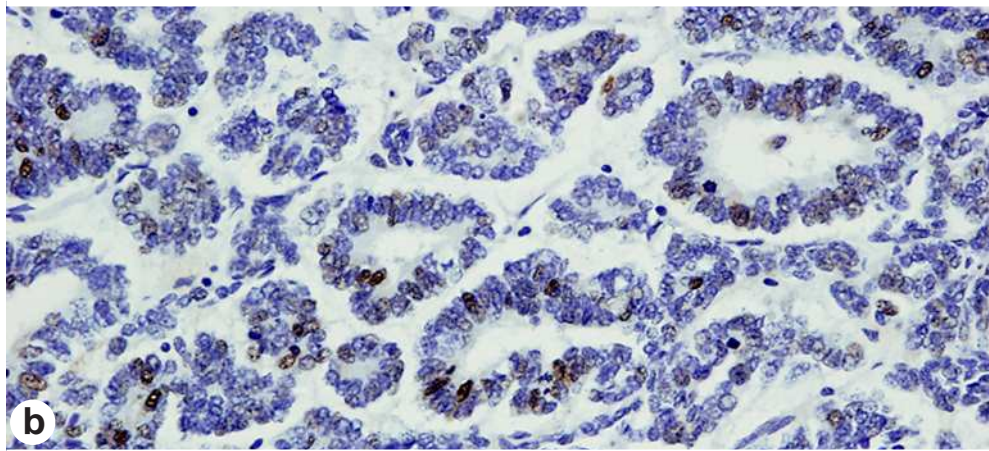
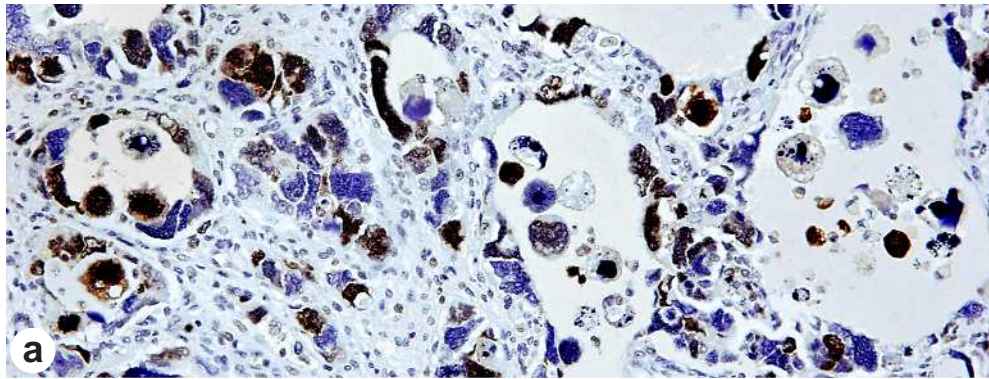




***Fig. 48. Expresión de Ki67 en el nefroblastoma***

- a)** La figura muestra un nefroblastoma con claros cambios nucleares de anaplasia, obsérvese la potente positividad nuclear para el epítotope Ki67 que resalta de mejor manera los cambios nucleares de los elementos epiteliales y blastematosos. El estroma no es inmunoreactivo. Anti- Ki-67-Hematoxilina. 40X.
- b)** En esta imagen, se observan hojas de túbulos de apariencia inmadura revestidos por epitelio cúbico, aunque la inmunoreactividad nuclear es intensa, también es escasa, lo que indica un índice de proliferación bajo. Anti- Ki-67-Hematoxilina. 40X.
- c)** Imagen que muestra un campo diferente del caso anterior, la positividad nuclear de las células epiteliales en este ejemplo de nefroblastoma de predominio epitelial es muy escasa y, por ende, el índice de proliferación es muy bajo. Anti- Ki-67-Hematoxilina. 40X.
- d)** En este ejemplo de nefroblastoma se observan frondas epiteliales y abundante estroma fibrovascular, la mayoría de las células epiteliales exhiben positividad nuclear; nótese como solo algunas de las células estromales muestran inmunomarcaje. Anti- Ki-67-Hematoxilina. 40X.

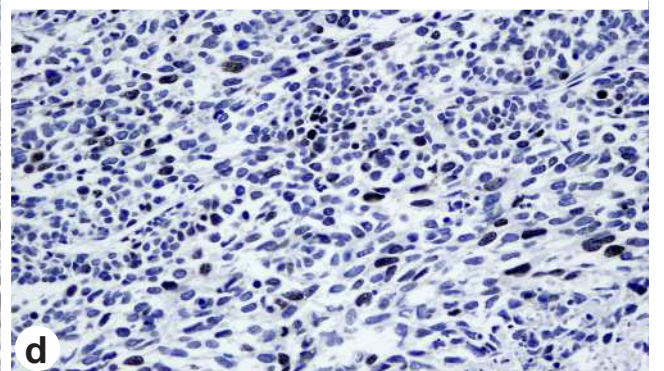
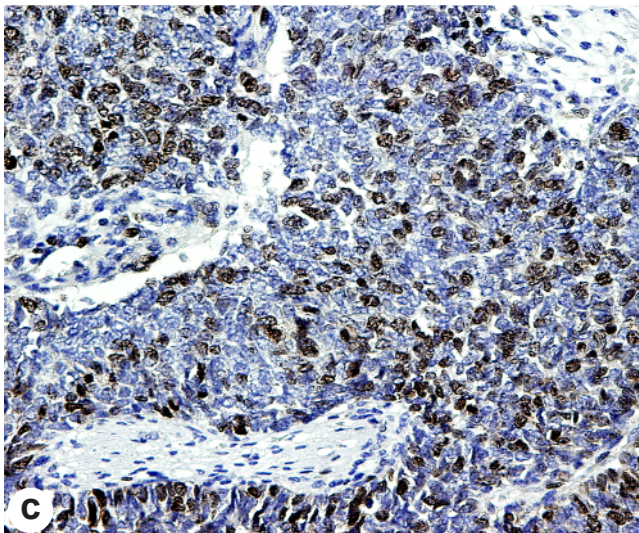
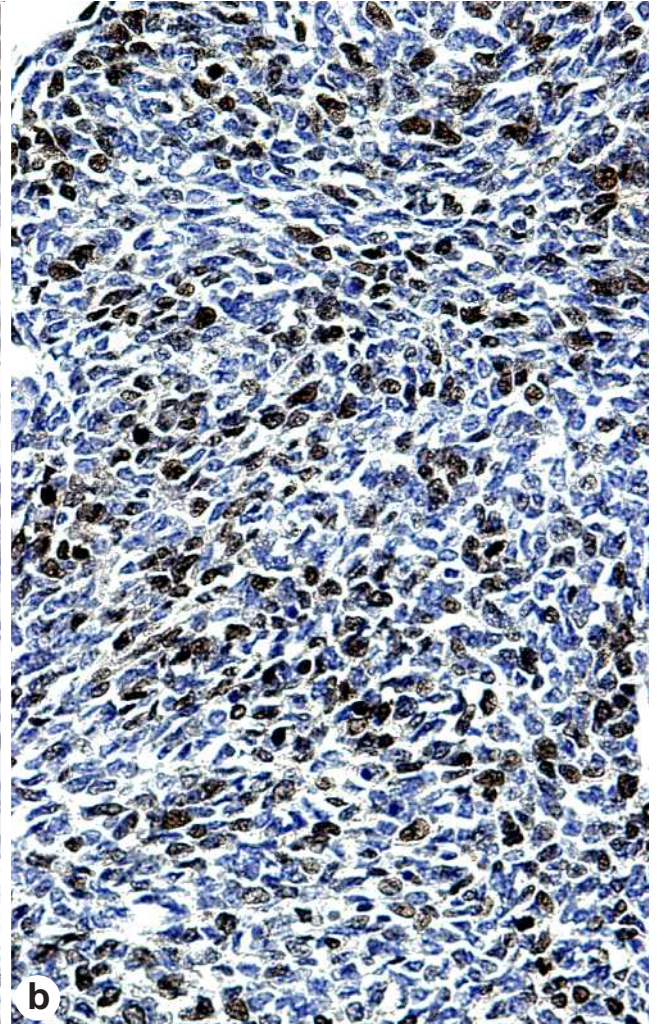
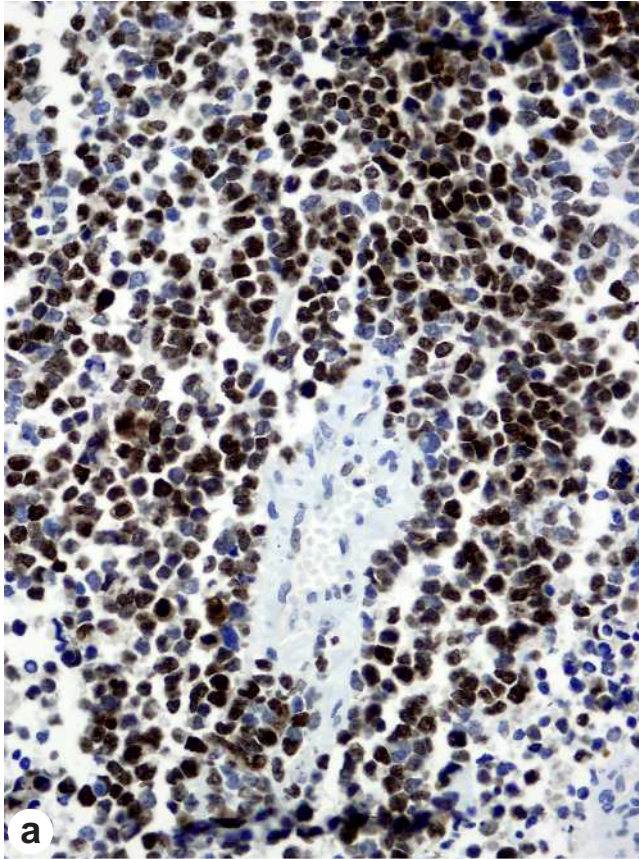




***Fig. 49. Expresión de Ki67 en el nefroblastoma***

- a)** La figura muestra una sábana de células blastemales indiferenciadas y de apariencia sincitial, se identifica actividad mitótica frecuente así como positividad nuclear intensa en la mayoría de las células, el índice de proliferación es alto. Anti- Ki-67-Hematoxilina. 40X.
- b)** En esta imagen, se observan hojas de células primitivas blastemales y estromales de apariencia muy inmadura que muestran positividad intensa con alto índice de proliferación celular. Anti- Ki-67-Hematoxilina. 40X.
- c)** La fotomicrografía muestra troncos o islotes gruesos e irregulares de células blastemales inmaduras, la positividad para el epítotope Ki6 exhibe moderada a potente intensidad en las células neoplásicas. Anti- Ki-67-Hematoxilina. 40X.
- d)** En este ejemplo de nefroblastoma se observa una hoja de células blastemales y estromales; nótese como solo algunas de las células estromales muestran inmunomarcaje con intensidad variable. Anti- Ki-67-Hematoxilina. 40X.





## DISCUSIÓN



El nefroblastoma es el tumor renal infantil más frecuente y representa la cuarta causa de cáncer en la edad pediátrica, precedido por leucemias/linfomas, neoplasias del sistema nervioso central y neuroblastomas. Esta neoplasia afecta a 1 de cada 10.000 niños en Norteamérica y, generalmente, se presenta antes de los cinco años de edad, suele desarrollarse en un sólo riñón y ocurre con igual frecuencia en ambos géneros, con o sin historia familiar. En ocasiones, este tumor puede afectar a ambos riñones y presentarse de manera congénita, lo cual tiene lugar en el 10% de los casos. La mayoría de los nefroblastomas son esporádicos (más del 90%). Los protocolos de tratamiento de este tumor han mejorado enormemente en los últimos años y la enfermedad, que antes era letal, tiene en la actualidad una tasa de cura superior al 90% en cinco años. La quimioterapia y la cirugía son las dos modalidades terapéuticas más frecuentemente empleadas, aunque la radioterapia también se usa pero queda reservada a los pacientes con estadios avanzados.

A diferencia de las neoplasias del adulto en las que los factores ambientales desempeñan un papel importante, en el nefroblastoma no existe factor ambiental alguno asociado a su desarrollo y, por el contrario, sí existen un grupo de genes involucrados directamente en el desarrollo y progresión de este tumor, así como síndromes que predisponen a su desarrollo. El tumor de Wilms junto con el retinoblastoma fueron los primeros tumores en ser estudiados por Knudsen et al.<sup>120</sup> en el desarrollo de su teoría del “doble golpe” genético. Tanto desde el punto de vista morfológico como desde el genético, el nefroblastoma es heterogéneo por lo que la descripción de los eventos moleculares de su oncogénesis aún no ha sido aclarada del todo.

En este trabajo hemos estudiado un total de 45 casos de nefroblastoma, de cada caso se revisaron secciones en hematoxilina y eosina para corroborar el diagnóstico y escoger el tejido más representativo y que incluyera todo el espectro morfológico del nefroblastoma, es decir, los tres componentes celulares que clásicamente se describen, los componentes epitelial, blastemal y estromal. Estos componentes se identificaron en cantidades variables dentro de un mismo tumor, aunque el patrón de crecimiento blastemal fue el que más predominó dentro del grupo de nefroblastomas estudiados. Todos los casos evaluados, excepto uno, correspondieron a nefroblastoma clásico de histología favorable. Desde el punto de vista histológico, los casos estudiados mostraron todo el espectro morfológico que un nefroblastoma puede ofrecer, los elementos epiteliales mostraron desde estructuras inmaduras tubulares simples hasta papilas arborescentes complejas, mientras que las zonas blastemales se manifestaron como festones,

islotes o cordones de células sincitiales de apariencia primitiva; así mismo, el estroma fue representado por tejido fibroso maduro así como por elementos estromales heterólogos. Adicionalmente, en cada caso se evaluó la inmunolocalización para cada epítipo estudiado. En concreto en el presente estudio se han evaluado un grupo de moléculas de adhesión en una neoplasia que recuerda morfológicamente los eventos del proceso de nefrogénesis.

Los tejidos fueron estudiados utilizando el método de inmunohistoquímica mediante la técnica de estreptoavidin-biotina. La ventaja de utilizar inmunohistoquímica es que es un método automatizado, bien aceptado y con alta reproducibilidad; al mismo tiempo, este método permite marcar una molécula e identificar su localización cuando está presente. Estas características fueron útiles ya que este método nos permitió evaluar la inmunoexpresión de las moléculas de adhesión del grupo cadherina-catenina.

En el presente estudio se ha evaluado un grupo de moléculas de adhesión celular pertenecientes al complejo cadherina-catenina (las cadherinas E y P y las cateninas alfa, beta, gamma y p120), con el objetivo de analizar semicuantitativamente la inmunoexpresión de estas moléculas, así como valorar si existen diferencias significativas en la intensidad de inmunomarcaje de estas moléculas en un tumor infantil primitivo de origen renal. El interés se centró en observar si la expresión de alguna de estas moléculas exhibía algún patrón que indicara una desregulación de las proteínas estudiadas. La intensidad de inmunomarcaje se ha determinado en los tres componentes histológicos del nefroblastoma, epitelial, blastemal y estromal; así mismo, en cada componente histológico se ha valorado la localización celular del inmunomarcaje (membranosa, citoplásmica y nuclear). Finalmente, la inmunoexpresión de dichas moléculas se ha comparado entre sí.

Mucho de lo que actualmente se sabe acerca de la caracterización de la patología molecular del nefroblastoma está íntimamente relacionado con los estudios previos sobre los eventos morfogenéticos del desarrollo renal y el desarrollo de las neoplasias renales infantiles.<sup>206</sup> En este contexto, algunos de los genes más importantes involucrados en los procesos del desarrollo renal -incluyendo la proliferación celular, la migración y la diferenciación- y que funcionan como factores de transducción, oncogenes y genes supresores de tumor, se han relacionado con el desarrollo del tumor de Wilms. Esto hace que el nefroblastoma sirva como paradigma en la comprensión de la pérdida de control del desarrollo de un órgano determinado y la ganancia de potencial tumorigénico. En el caso específico del

nefroblastoma, son varios los genes asociados con su desarrollo; sin embargo, la expresión o inactivación de un sólo gen no explica por sí sola el desarrollo y progresión de este tumor.<sup>199</sup> No obstante, cabe esperar que al menos un grupo de genes, dentro de los más implicados en el desarrollo del riñón, también participe directamente en el desarrollo del nefroblastoma. La activación o inactivación de ciertas proteínas pudieran funcionar como un interruptor que termina un paso para dar inicio a otro dentro de un mismo proceso de oncogénesis, lo que explicaría porqué más de una proteína se expresan dentro de un mismo tumor con diferencias de tiempo y espacio.

Basándonos en estudios previos, se ha planteado la hipótesis de la desregulación de la expresión de las moléculas de adhesión del grupo cadherina-catenina y el papel que estas desempeñan en el proceso de iniciación y progresión del nefroblastoma.  $\beta$ -Catenina, una molécula que cumple una doble función pues interviene tanto en la adhesión celular, como en el proceso de transcripción en la vía Wnt, ha sido incluida para este estudio. La implicación de  $\beta$ -catenina ha surgido a partir de modelos *in vitro* y de experimentación animal que estudian la diferenciación celular. A partir de estos estudios ahora se sabe que existe una intrincada red de señales moleculares por medio de las cuales se comunican la yema ureteral y el mesénquima metanéfrico; estas señales orquestan el comportamiento de los componentes celulares durante el desarrollo renal para completar el delicado proceso de nefrogénesis, cualquier cambio mutacional que desregule la expresión en tiempo o espacio de las moléculas que participan en este proceso puede ser catastrófico y provocar una malformación del tracto urinario o, inclusive, una neoplasia genitourinaria.

Algunos aspectos específicos de la nefrogénesis han sido implicados en el desarrollo del nefroblastoma. En este contexto, *WT1* es clave en el fenómeno de inducción de la yema ureteral y la subsecuente supervivencia del mesénquima metanéfrico. La vía Wnt también tiene un rol importante en la inducción de la transformación mesénquimo-epitelial del mesénquima metanéfrico<sup>193</sup> Así mismo, se sabe que la inactivación de *WT1* ocurre en el 10% de los nefroblastomas, y que los tumores que son portadores de esta mutación a menudo presentan también mutaciones en  $\beta$ -catenina. Por tanto, la vía Wnt que participa en la nefrogénesis también está implicada en el desarrollo del nefroblastoma. Gran parte de lo que se sabe acerca de Wnt y nefroblastoma deriva del estudio de *WT1*. La expresión de este gen está exquisitamente regulada en el tejido embrionario renal y es esencial para su desarrollo;

mutaciones o deleciones de *WT1* pueden ser causantes de malformaciones del tracto genitourinario. Por ejemplo, la proteína WT1 localizada en 11p13 se detectó inicialmente en pacientes con Síndrome WAGR (por sus siglas en inglés Wilms, Aniridia, malformaciones Genitales, Retardo mental);<sup>50</sup> este gen mostró deleciones, así como pérdida de heterozigocidad, en 11p. WT1 es una proteína de 50 kb que codifica para múltiples isoformas proteicas cuya característica común es poseer un sitio de unión con un dominio N-terminal rico en prolina y glutamina, y un dominio C-terminal de unión para ADN y ARN que contiene cuatro repeticiones digitiformes de zinc muy similares a las encontradas en el factor temprano de crecimiento. *WT1* funciona normalmente como gen supresor de tumores inhibiendo el ciclo celular e induciendo la apoptosis;<sup>221</sup> los pacientes con nefroblastoma heredan un alelo anormal o mutado y la segunda mutación, o somática, tiene lugar después del nacimiento, esto ocurre hasta en el 20% de los casos.

Por otro lado, *WT2* exhibe pérdida de heterozigocidad en el 40-50% de los tumores de Wilms esporádicos.<sup>201</sup> Este es otro locus genético asociado al desarrollo del nefroblastoma, y la pérdida de material genético está limitada a 11p15, lo cual implica pérdida de un gen supresor de tumor.<sup>82</sup> La pérdida de heterozigocidad en 16q ocurre entre el 17 y el 25% de los tumores de Wilms esporádicos<sup>25</sup> y está asociada con un pobre pronóstico; 16q es el locus genético de cadherina-E, a veces llamada Uvomorulina. La cadherina-E es una molécula de adhesión relacionada con la adhesión celular dependiente de calcio y con un papel importantísimo en el desarrollo de las estructuras epiteliales, así como en la organización estructural y funcional de las uniones intercelulares.<sup>93,103,107</sup> En nuestro trabajo, incluimos cadherina-E con el objetivo de observar su expresión en el nefroblastoma y, de ser posible, encontrar las relaciones entre su expresión e inmunolocalización comparadas con las de  $\beta$ -catenina.

La pérdida de heterozigocidad en 16q en el nefroblastoma indica una posible pérdida de un gen supresor de tumor. Hasta la fecha aunque existe conocimiento de esta pérdida en 16q, el supuesto gen supresor de tumores en esta localización no ha sido caracterizado; aún más, la relación que existe, si es que la hay, entre este supuesto gen y el gen supresor de tumores cadherina-E, no ha sido aclarada; sin embargo, el gen de cadherina-E también se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 16. Además, la molécula de adhesión cadherina-E se ha postulado como candidata responsable de los casos de nefroblastoma con alteraciones en 16q.<sup>212</sup> Algunos estudios han demostrado que las mutaciones en cadherina-E tienen un papel



específico en el desarrollo de neoplasias malignas del adulto, tales como: carcinoma gástrico, carcinoma lobulillar de glándula mamaria y carcinomas de ovario y endometrio; en este último, además, recientemente se han descrito otros biomarcadores con un importante valor predictivo de recidiva.<sup>150</sup> Se cree que las fluctuaciones en la adhesión celular son una clave importante en la progresión de una neoplasia localizada y su extensión a sitios lejanos (metástasis). De hecho, existe una relación directa entre la expresión anómala de cadherina-E y estadios avanzados en distintas neoplasias malignas en el humano.<sup>165</sup> Sin embargo, en los casos en los que las neoplasias malignas no muestran pérdida de expresión membranosa de cadherina-E, las alteraciones en la adhesión celular pueden estar relacionadas con una función anómala de las cateninas, a las que cadherina-E se asocia normalmente. Además, se sabe que la expresión de cadherina-E es necesaria en el desarrollo renal, por ejemplo la expresión secuencial en tiempo y espacio es esencial para la formación de las uniones adherentes en el epitelio tubular renal, así como para la correcta implementación de la polaridad celular epitelial.<sup>73</sup> Estos hallazgos hacen que la molécula de adhesión cadherina-E sea un candidato razonable en el desarrollo del tumor de Wilms.

En nuestro trabajo, hemos estudiado la expresión de cadherina-E al igual que la de otros miembros del grupo de las moléculas de adhesión, incluyendo cadherina-P,  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina,  $\gamma$ -catenina y p120. Observamos expresión de cadherina-E en 26 de los 45 casos analizados (57.7%); este porcentaje es bajo comparado con el 77% reportado en estudios previos.<sup>212</sup> Encontramos positividad tanto en los componentes epiteliales, como en los blastemales y estromales; sin embargo, como era de esperar, la mayoría de los casos positivos correspondieron al componente epitelial (22 casos), once de estos mostraron expresión concomitante en el componente celular blastemal. La expresión de cadherina-E exhibió positividad de moderada a intensa en la membrana celular de las estructuras epiteliales neoplásicas, incluyendo las zonas basal, lateral y apical. Esta última inmunolocalización de cadherina-E no es común en el epitelio renal no neoplásico. Es probable que esta expresión apical anómala sea el reflejo de un cambio mutacional en esta molécula de adhesión, o que sea parte de la desregulación de los procesos de transformación mesénquimo-epitelial, así como de la polaridad celular, a los que están sujetos las células en el proceso de transformación maligna en el nefroblastoma.

De manera interesante, el único caso positivo en el componente estromal exhibió intensa positividad en la región nuclear. La acumulación nuclear de cadherina-E ha sido previamente descrita en neoplasias malignas de origen epitelial, y, además, la expresión de ésta molécula en algunas neoplasias malignas también muestran un aumento de expresión de los genes ciclina D1 y MYC.<sup>229</sup> Algunos estudios han sugerido que cadherina-E posee una función sobre p120 al exportarla al núcleo, y que la acumulación nuclear de cadherina-E es debida a una alteración en su degradación proteosómica por 26S. Este último fenómeno hace que cadherina-E se acumule en el citoplasma y, subsecuentemente, se transloca al núcleo donde podría participar en la expresión génica modulando la vía Wnt.

La expresión de cadherina-E en las células epiteliales del riñón no neoplásico en el humano ha sido descrita principalmente en la región basolateral de la membrana celular y en la región intercelular. La expresión de esta molécula en el riñón en desarrollo significa que la transformación mesénquimo-epitelial ya ha ocurrido y, por lo tanto, la célula ha quedado polarizada; es decir, las caras laterales, basal y apical cumplen funciones estructurales y fisiológicas específicas para cada una de ellas, donde las caras laterales se adhieren unas con otras de manera estrecha pero al mismo tiempo pueden enviar o recibir mensajes moleculares, mientras que la cara basal interactúa con la lámina basal y recibe mensajes a través de ella desde la matriz extracelular.<sup>112</sup> La región apical es especial en el sentido en que interactúa con el espacio extracelular cumpliendo funciones todavía más complejas. Básicamente, cadherina-E participa en el mantenimiento de la integridad de las uniones intercelulares, incluyendo los aspectos funcionales y la morfología de las células epiteliales del riñón no neoplásico del adulto. Cuando cadherina-E sufre una mutación, la expresión fenotípica de esta molécula puede ser aberrante, por ejemplo, cadherina-E puede expresarse de manera anómala en la región apical, en el citoplasma o en el núcleo.<sup>212</sup> En el presente estudio, la inmunoexpresión de cadherina-E fue potente en la membrana celular tanto del epitelio, como del blastema y de los elementos estromales; sin embargo, en algunos casos la expresión resultó aberrante en la región apical de la membrana celular y en el citoplasma formando toscos grumos sub-apicales. Esta expresión no común o aberrante podría tener relación con un cambio en la misma molécula de cadherina-E o ser el resultado de la desregulación de alguna de las moléculas de adhesión con las que interactúa cadherina-E. En este estudio, la expresión membranosa de cadherina-E mostró no tener valor significativo comparada con la expresión intracitoplasmática de las cateninas; esto sugiere que los cambios mutacionales que cadherina-E puede sufrir en

determinado momento no alteran la adhesión celular pues, como es sabido, diferentes cadherinas -e incluso las cateninas- pueden suplantar o suplir los efectos que cadherina-E posee sobre la adhesión celular<sup>3,38,83</sup>

La expresión de cadherina-P ha sido descrita en la porción del riñón en desarrollo que origina el epitelio tubular del túbulo distal, y sus niveles disminuyen en el riñón adulto no neoplásico. En este estudio, la expresión de cadherina-P resultó ser muy escasa y se manifestó principalmente en la región intracitoplasmática del componente epitelial con finos grumos, particularmente en la zona sub-apical de las células epiteliales maduras; solo dos casos revelaron positividad nuclear, este hecho no tiene relación alguna con el resto de las moléculas de adhesión y podría ser meramente una expresión aberrante. La expresión de cadherina-P en los componentes estromal y blastemal fue aún menor aunque en estos dos últimos casos también se observó expresión nuclear.

Dentro del grupo de las cateninas, las moléculas de adhesión  $\alpha$ -catenina, p120 ( $\delta$ -catenina) y  $\gamma$ -catenina mostraron expresión similar.  $\alpha$ -Catenina fue la molécula que presentó menos casos positivos; la positividad para este epítipo fue más frecuente en la región intracitoplásmica de los epitelios y los elementos blastematosos, mientras que el estroma sólo mostró positividad en un caso.

La expresión de p120 en este estudio mostró más casos positivos comparados con  $\alpha$ -catenina y  $\gamma$ -catenina. La membrana celular y la región intracitoplasmática de los elementos epiteliales, y también de los blastemales, mostraron positividad. En la membrana celular, p120 se expresó delineando el contorno celular mientras que, en el citoplasma, p120 formó finos grumos alojados cerca de la membrana celular. En el núcleo, p120 exhibió positividad en dos casos; la localización nuclear de p120 ya ha sido documentada previamente, aunque su función específica en este sitio no ha sido completamente esclarecida<sup>9,107</sup>

En nuestro estudio también se evaluó  $\gamma$ -catenina, otro miembro de la familia de las moléculas de adhesión. Los resultados obtenidos para este epítipo mostraron ser muy similares a los observados con  $\alpha$ -catenina. El riñón no neoplásico mostró potente positividad intracitoplásmica en forma de toscos grumos exclusivamente en las células del epitelio tubular. En los casos estudiados de nefroblastoma,  $\gamma$ -catenina se expresó predominantemente en el citoplasma de los epitelio; no obstante, los elementos inmaduros blastematosos también

expresaron la proteína. Así mismo, se detectó expresión membranosa y también nuclear, aunque en menor cuantía. Los resultados obtenidos en este grupo en particular ( $\alpha$ -catenina, p120 y  $\gamma$ -catenina) mostraron ser muy similares, con pobre reactividad para estos epítopes. Se conoce la expresión de estas moléculas en el riñón en desarrollo; debe recordarse que las moléculas de adhesión participan en las etapas tempranas de la nefrogénesis, uno de los eventos cruciales de ésta es el proceso conocido como transformación mesénquimo-epitelial, donde el mesénquima metanéfrico se transforma para dar origen a los elementos epiteliales del riñón adulto, este proceso incluye los fenómenos de re-estructuración de la membrana celular donde ésta adquiere la propiedad de interactuar con células cercanas y adherirse a las mismas, cada una de las caras de la membrana celular adquiere una función específica para interactuar con las células vecinas, la matriz extracelular y la zona apical de los futuros túbulo renales; una vez que esto ha sucedido, la célula ha sido polarizada y, a partir de la polarización, pueden identificarse las moléculas de adhesión.<sup>127</sup> En particular, cadherina-E es un marcador de este fenómeno. De otra parte, debe recordarse que las cateninas tales como alfa, beta, gama y p120 interactúan con el dominio intracitoplásmico de cadherina-E actuando como reguladores de la función que esta ejerce sobre la membrana celular como molécula de adhesión; por lo que la expresión de las cateninas está sujeta a la de cadherina-E. En el caso de un tumor primitivo con diferentes patrones de crecimiento, como es el caso del nefroblastoma, y que recapitula los eventos morfogenéticos del desarrollo renal, cabe esperar que la expresión de las moléculas de adhesión dependa del componente que está sujeto a estudio, es decir, del grado de maduración que una célula determinada posee. En nuestro estudio, la mayoría de los casos positivos resultaron en los elementos epiteliales de apariencia madura pero también en los blastemales; en estos últimos, aunque no mostraron fenotipo epitelial maduro, el solo hecho de formar conglomerados celulares de aspecto sincitial refleja la capacidad de estas células de agregarse o conglomerarse, capacidad que les ha sido otorgada por la función de las moléculas de adhesión, por lo que se asume que la expresión de las moléculas de adhesión ha comenzado; hay que resaltar que, además de estos hallazgos, la expresión escasa o casi nula de las cateninas alfa, gama, y p120 en los elementos estromales son el mejor ejemplo de lo arriba mencionado.

La expresión de  $\beta$ -catenina en este estudio resultó ser muy diversa, específicamente, la evaluación de la acumulación intracitoplásmica y la localización nuclear de  $\beta$ -catenina fue de gran interés pues, como ya se ha mencionado previamente, es esta última la característica que buscábamos en este grupo de tumores debido a que la expresión nuclear aberrante es la que ha

sido descrita en el desarrollo y progresión tumoral,<sup>31,156</sup> y las mutaciones de  $\beta$ -catenina en el nefroblastoma han sido reportadas independientemente del tipo de histología, ya sea esta favorable o desfavorable.

A diferencia de otras neoplasias genitourinarias de la edad pediátrica donde el contenido de ADN y la actividad proliferativa desempeñan un papel importante en el pronóstico,<sup>206</sup> la presencia de mutaciones de *CTNNB* en el nefroblastoma no ha sido relacionada con un comportamiento biológico agresivo. En el riñón no neoplásico la expresión de  $\beta$ -catenina es heterogénea, las células del epitelio tubular muestran positividad discreta con gránulos finos en el citoplasma mientras que en la membrana celular se expresa de manera más potente, predominantemente en las caras laterales donde se localizan las uniones adherentes. En nuestro estudio, la expresión de  $\beta$ -catenina fue identificada en 34 de los 45 tumores investigados, así como en el tejido renal no neoplásico cuando este estuvo disponible. El tejido renal no neoplásico mostró positividad en el glomérulo y en los túbulos, pero predominantemente en este último, la inmunoreactividad observada fue casi exclusiva de la región subcelular basolateral y apical del epitelio tubular renal, tanto de la corteza como de la médula, donde  $\beta$ -catenina mostró potente positividad además de ausencia de expresión nuclear de las células del epitelio así como del estroma y vasculatura renal, tal y como previamente ha sido reportado en la literatura,<sup>122,123</sup> la región citoplásmica presentó positividad finamente granular. Estos hallazgos indican el importante papel que  $\beta$ -catenina desempeña en la adhesión celular, además de su función como activador de la transcripción en la vía Wnt. Cabe destacar la observación de expresión de  $\beta$ -catenina en la porción apical de las células de los componentes epiteliales tubulares; esta expresión aberrante de  $\beta$ -catenina indica que los cambios mutacionales en este gen también pueden afectar a la polaridad celular planar, otro de los fenómenos regulados por Wnt pero que no son directamente dependientes de  $\beta$ -catenina.<sup>215,233</sup> Aunado a estos hallazgos, cadherina-E también mostró esta expresión apical anómala en las células epiteliales.

Adicionalmente, se constató ausencia de expresión de  $\beta$ -catenina en el compartimento intersticial del tejido renal no neoplásico, los vasos sanguíneos del intersticio y las asas capilares glomerulares. A la postre, la evaluación del tejido renal no neoplásico nos sirvió de control interno, validando así la ejecución de la técnica de inmunohistoquímica.



La expresión de  $\beta$ -catenina fue más importante en la región membranosa de las células y predominantemente en el componente epitelial, donde en la mayor parte de los casos se observó positividad en la región apical. En algunos casos la positividad delineaba perfectamente todo el contorno de la célula con positividad moderada a intensa. Los componentes blastemal y estromal también mostraron positividad membranosa aunque en menor cantidad, pero también con intensidad similar. La inmunoexpresión con diversidad fenotípica en el nefroblastoma es el reflejo del grado de maduración de los diferentes componentes celulares. Estos componentes recapitulan fielmente los diferentes procesos de la nefrogénesis; por ello, la inmunoexpresión de las moléculas estudiadas se comporta de manera diferente en los diferentes elementos celulares; mientras que la parte epitelial, histológicamente madura, expresó el epítipo  $\beta$ -catenina en las membranas celulares, principalmente en la región lateral y apical, los elementos blastemales (de aspecto más inmaduro) exhibieron positividad en forma de finos grumos en el espacio intracitoplasmático. Por otro lado, en este estudio se encontraron diez casos (22,2%) con positividad nuclear para la proteína  $\beta$ -catenina, dos de esos casos estudiados resultaron positivos en los elementos celulares fenotípicamente estromales, otros cinco casos resultaron positivos en la parte blastemal de los nefroblastomas estudiados, y observamos tres casos positivos con inmunolocalización nuclear en elementos con inmunofenotipo epitelial maduro. La positividad nuclear se mostró con intensidad de moderada a fuerte en todos los casos observados. Siete de estos casos resultaron poseer histología favorable y solo uno mostró los cambios histológicos de histología desfavorable, este último caso además mostró expresión para el epítipo  $\beta$ -catenina en el compartimento intracitoplasmático, así como positividad débil en la membrana celular de las células epiteliales y blastematosas; estos hallazgos son similares a lo reportado previamente en la literatura, sin embargo, ahora se sabe que la mayoría de los casos con mutaciones en *CTNNB* corresponden a nefroblastomas con elementos heterólogos.<sup>55,122,123,146</sup> En nuestro estudio, observamos positividad nuclear para  $\beta$ -catenina no solo en los casos con elementos heterólogos sino también en los componentes epiteliales y en los blastemales.

Interesantemente, en nuestro estudio observamos que los elementos estromales positivos para el epítipo  $\beta$ -catenina ocurrieron en elementos heterólogos consistentes en células con diferenciación rabdomioblástica, así como elementos celulares estromales con diferenciación fibroblástica. La detección de mutaciones en  $\beta$ -catenina implica su estabilización, acumulación

intracelular y translocación nuclear; la mayoría de estas mutaciones han sido reportadas en la región N-terminal de la proteína, específicamente en los residuos de los codones 32, 33, 34, 37, 41 y 45, esta última es una región codificada por el exón 3.<sup>35,55,203,216</sup> Los codones 33, 37, 41 y 45 corresponden a residuos de serina/treonina, que son el sitio de fosforilación de  $\beta$ -catenina por GSK3.<sup>60,90</sup> En este estudio hemos tratado de detectar la acumulación de la proteína mediante un método inmunológico. Observaciones previas indican que la positividad nuclear para  $\beta$ -catenina es independiente del estatus del tumor, ya sea este o no de histología favorable, e independiente del estadio clínico.<sup>122</sup> Koesters et al.<sup>122</sup> inicialmente reportaron una serie de casos con acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina (67% de los casos estudiados), predominantemente en aquellos tumores que presentaban elementos estromales heterólogos (un fenómeno no raramente visto en el nefroblastoma). Este porcentaje parece mucho mayor al obtenido por nosotros, no obstante debe mencionarse que en nuestro trabajo un muy pequeño grupo de casos correspondieron a nefroblastomas con elementos heterólogos.

Adicionalmente, en el estudio de Koesters et al.<sup>122</sup> cuando compararon el estatus mutacional en este grupo específico con la expresión de  $\beta$ -catenina mediante técnica inmunohistoquímica, se encontró que nueve de los nueve casos con elementos heterólogos mostraron cambios mutacionales en *CTNNB*. El porcentaje de células que exhiben positividad nuclear para  $\beta$ -catenina ha sido reportado entre el 5-10% de las células neoplásicas.<sup>123,144</sup> Sin embargo, un dato interesante es el hecho de que es posible no detectar mutaciones mediante técnicas de biología molecular en aquellos casos en los que se ha demostrado positividad nuclear para el epítipo  $\beta$ -catenina estudiada mediante técnicas de inmunohistoquímica. Por el contrario, pueden detectarse mutaciones en  $\beta$ -catenina en células que no exhiben positividad nuclear. Estas observaciones se han realizado en estudios que utilizan microdissección para evaluar nefroblastomas con o sin acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina. Estos hallazgos pueden parecer contradictorios en relación con la sensibilidad y especificidad de la inmunolocalización de  $\beta$ -catenina; sin embargo, hay que resaltar que la vía Wnt se asocia con el desarrollo de otro tipo de tumores además del nefroblastoma, donde la mutación puede ser localizada en el mismo gen  $\beta$ -catenina o en otras moléculas asociadas a ella, tales como axina o APC (como es el caso del adenocarcinoma colónico), por lo que no necesariamente el daño genético responsable del desarrollo de una neoplasia determinada afecta directamente a  $\beta$ -catenina. La heterogeneidad intratumoral de la inmunoexpresión que  $\beta$ -Catenina presenta en las neoplasias

en el humano ha sido previamente documentada, por ejemplo, en hepatoblastomas la inmunoeexpresión de  $\beta$ -catenina puede estar presente en las células estromales (cartílago, hueso y tejido adiposo) pero ausente en las células epiteliales; estudios de biología molecular aplicando microdissección han detectado mutaciones idénticas en ambos componentes (las que expresan acumulación nuclear y las que no) por lo que la inmunolocalización nuclear no necesariamente significa una consecuencia de mutaciones en  $\beta$ -catenina, si no que más bien podría corresponder a un prerrequisito de iniciación de una neoplasia<sup>122</sup>

De otra parte, debe recordarse que el desarrollo del riñón normal es el resultado de numerosos eventos moleculares sucesivos perfectamente bien coordinados por señales moleculares, en las que se encuentran involucradas numerosas moléculas, tales como factores de transducción, factores de crecimiento, protooncogenes y genes supresores de tumor incluyendo factores de proliferación vascular.<sup>151</sup> Estas mismas moléculas han sido asociadas con el desarrollo del nefroblastoma y, de hecho, existe mucha similitud, desde el punto de vista morfológico, entre el riñón en desarrollo (específicamente en los estadios tempranos donde se desarrolla el fenómeno de transición mesénquimo-epitelial), el nefroblastoma y sus lesiones precursoras (restos nefrogénicos). El tumor de Wilms exhibe gran diversidad tanto fenotípica, como molecular. Esta diversidad en la expresión génica del nefroblastoma ha dado pie al desarrollo de nuevas teorías en el desarrollo de este peculiar tumor infantil. Un ejemplo lo constituye el reciente estudio realizado por Fukuzawa et al.<sup>64</sup> quienes postulan que los diferentes linajes celulares observados en el nefroblastoma están gobernados y determinados por diferentes vías de señales moleculares, por lo que la inmunolocalización de  $\beta$ -catenina es útil y merece la pena utilizar el método inmunohistoquímico para la evaluación de esta molécula. En este estudio se determinó que la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina puede detectarse en presencia o ausencia de mutaciones en *CTNNB1* en aquellos nefroblastomas con elementos estromales heterólogos. Se demostró la ausencia de acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina aún en presencia de mutaciones en este gen en los componentes epiteliales de los nefroblastomas con elementos epiteliales y estromales heterólogos, pero sí pudo observarse en la región membranosa y en el citoplasma de las células tumorales de fenotipo epitelial. Esta información indica que probablemente  $\beta$ -catenina tiene otra función en la génesis de los elementos epiteliales del nefroblastoma. En este caso la activación de  $\beta$ -catenina y su localización membranosa puede funcionar como un desregulador de los procesos estructurales

y funcionales de las uniones adherentes de las células tumorales y de esa manera alterar los procesos de la diferenciación epitelial, incluyendo el establecimiento de la polaridad celular; estos hallazgos indican que las mutaciones de  $\beta$ -catenina pueden ser responsables de la expresión aberrante de las moléculas de adhesión de la familia cadherina-catenina pero no necesariamente  $\beta$ -catenina es responsable directo de la oncogénesis del nefroblastoma sin elementos heterólogos.

Por otra parte, el nefroblastoma con elementos heterólogos frecuentemente se asocia con restos nefrogénicos intralobares y estos últimos presentan con frecuencia mutaciones en *WT1*; a su vez, la presencia de elementos heterólogos parece ser un marcador fenotípico de la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina<sup>65,196</sup> y, dado que  $\beta$ -catenina se asocia con pérdida alélica de *WT1*, ambos genes, *CTNBI* y *WT1*, parecen mostrar un fenómeno de sinergia que condiciona el desarrollo del nefroblastoma y además gobierna el linaje celular expresado fenotípicamente como elementos estromales heterólogos. Estos interesantes hallazgos indican que el papel que  $\beta$ -catenina desempeña en el desarrollo y progresión de un tumor con gran diversidad fenotípica, como la observada en el nefroblastoma, parece ser solo una parte del rompecabezas. Aún más interesante es el hecho de que la acumulación de  $\beta$ -catenina en estos tumores parece expresarse de manera temprana en el desarrollo y progresión tumoral, pues se ha descrito que, además de la expresión nuclear,  $\beta$ -catenina puede verse en la región membranosa y citoplasmática de las células tumorales mediante técnica de inmunohistoquímica. Estas observaciones fueron realizadas por el grupo de estudio de Fukuzawa et al.<sup>65</sup> quienes compararon dos grupos de nefroblastomas, el primero conformado por 15 tumores con presencia de elementos estromales heterólogos, de este grupo, nueve tumores exhibieron restos nefrogénicos intralobares. Doce tumores fueron analizados por inmunohistoquímica y, de estos, diez mostraron mutaciones en  $\beta$ -catenina y siete mostraron mutaciones en *WT1*. Los doce tumores analizados mostraron acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina. La presencia de acumulación nuclear y mutaciones en  $\beta$ -catenina resultó ser exclusiva de este grupo. El grupo conformado por nefroblastomas carentes de elementos estromales heterólogos no mostró ni acumulación nuclear ni mutaciones en  $\beta$ -catenina.

Por estos hallazgos puede deducirse que, la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina depende de un grupo selecto de nefroblastomas que exhiben ciertas características fenotípicas y que existe un sinergismo entre dos genes previamente descritos, uno que se activa al desarrollar una

mutación ( $\beta$ -catenina), y otro que pierde su función como gen supresor de tumores (*WT1*). La manera en la que la vía Wnt funciona en el desarrollo y progresión del nefroblastoma con elementos heterólogos ha sido sujeta a escrutinio; se sabe que la vía Wnt participa en la regulación de las células madre en adultos y en las células madre embrionarias<sup>167,169,170</sup> en el riñón en desarrollo. Se observa  $\beta$ -catenina con expresión nuclear en las células estromales de la región medular, por lo que se deduce que se requiere la participación de Wnt en la autorrenovación celular de los diferentes componentes celulares del compartimento intersticial, así como en los procesos de diferenciación específica de los elementos estromales heterólogos del nefroblastoma.

Se sabe también que las mutaciones en  $\beta$ -catenina y la activación persistente de la vía Wnt puede llevar a un estado de autorrenovación exagerado y sostenido de células progenitoras, y esta es la manera en que se originan algunos tumores en el humano.<sup>169</sup> Además de estas características moleculares, recientemente *WTX* ha surgido como un gen asociado con el desarrollo de neoplasias malignas tanto en el paciente pediátrico como en el adulto. Aunque originalmente se describió *WTX* en asociación con nefroblastoma,<sup>148</sup> existe evidencia de que *WTX* se encuentra asociado con neoplasias malignas de origen hematopoyético, estómago, colon y recto, además de carcinoma hepatocelular.<sup>175,267</sup> Se ha postulado que *WTX* es un regulador negativo de la vía canónica Wnt; se ha identificado que *WTX* forma un complejo con axina, APC y  $\beta$ -catenina en el citoplasma. *WTX* antagoniza la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina al interactuar directamente con  $\beta$ -Catenina promoviendo su degradación.<sup>145</sup> Este gen (también llamado *AMERI*) está localizado en Xq11.1 y codifica para una proteína de 135 aminoácidos. Los cambios mutacionales encontrados en este gen fueron el resultado de un estudio en donde se investigaron alteraciones en el número de copias de ADN proveniente de nefroblastomas; se utilizó una pantalla de alta resolución en donde se encontraron pequeñas deleciones en un gen localizado en el cromosoma X, al cual llamaron *WTX*. Este gen codifica para un gen supresor de tumor que esta inactivo en nefroblastomas. La particularidad de este gen es que la forma en la que desarrolla la mutación inicial es poco común para un gen supresor de tumor. La mayoría de los genes supresores de tumor desarrollan una mutación en la línea germinal, este fenómeno se define como el primer “golpe genético”; posteriormente, las células reciben un “segundo golpe” que afecta a la línea somática inactivando ambos alelos. En el caso de *WTX*, un solo golpe genético puede tener consecuencias fenotípicas catastróficas si el gen afectado se encuentra en el cromosoma X (asociado a X), pues *WTX* estaría afectado en la única copia del



cromosoma X cuando el nefroblastoma proviene de un varón. En el caso de los nefroblastomas desarrollados en individuos del sexo femenino, *WTX* se encuentra mutado en la copia activa del cromosoma X.

Recientemente se ha demostrado que *WTX* forma un complejo en el citoplasma con axina, APC y  $\beta$ -catenina y, de esta manera, antagoniza la vía Wnt/ $\beta$ -catenina al promover la ubiquitinización y degradación proteosómica de  $\beta$ -catenina, bloqueando su actividad regulatoria genética. Algunos estudios han demostrado que el nefroblastoma exhibe mutaciones en *WTX* y *CTNNB1* de manera separada.<sup>136</sup> En otro estudio, Ruteshouser et al.<sup>199</sup> evidenciaron que las mutaciones en *WTX* y *CTNNB1* pueden coexistir; sin embargo, la mayoría de las mutaciones encontradas en *CTNNB1* están en el exón siete u ocho, lo que -a diferencia de las que se localizan en el exón 3- no afecta a los residuos de serina/treonina; y, dado que estos residuos son los sitios de fosforilación de  $\beta$ -catenina, puede que estas mutaciones no alteren de manera constitutiva a  $\beta$ -catenina. Esto apoya la idea de que, aunque *WTX* y  $\beta$ -catenina estén relacionadas, funcionan de manera independiente.

Alternativamente, se ha propuesto a *WNT* como compañero de APC en la función de control de la distribución subcelular de APC, entre la membrana celular y los microtúbulos de las células epiteliales. La descripción de *WTX* pudiera explicar porqué algunos nefroblastomas presentan acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina pero no exhiben mutaciones en *CTNNB1*. En resumen, se ha propuesto que *WTX* está involucrado en la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y en el desarrollo y progresión del nefroblastoma; sin embargo, el papel que realiza en este tumor depende de sus múltiples funciones, así como del linaje celular y del tiempo en el que se origina un nefroblastoma en particular. Es decir, si el “error” genético sucede muy temprano en el desarrollo del nefroblastoma, la lesión precursora generalmente corresponde a restos nefrogénicos intralobares, estos pueden dar origen a elementos inmaduros con capacidad de originar componentes celulares estromales con o sin elementos heterólogos. En este último caso, frecuentemente existe mutación en *WT1* y acumulación intranuclear de  $\beta$ -catenina, lo cual indicaría mutaciones en *CTNNB1*, este último gen parece regular la diferenciación del componente estromal. La patología molecular del nefroblastoma es compleja e incluye un grupo heterogéneo de genes.

Aunque no existe relación directa entre el índice de proliferación y el comportamiento biológico del nefroblastoma, de manera complementaria en el presente trabajo, además de

haber evaluado un grupo de moléculas de adhesión del grupo cadherina-catenina, hemos analizado la actividad proliferativa tumoral mediante el estudio del índice de proliferación celular utilizando el inmunomarcador Ki67. Como cabría esperar en cualquier tumor primitivo, como el nefroblastoma, hemos encontrado actividad proliferativa tumoral con diferentes índices de proliferación en todas las expresiones fenotípicas de esta neoplasia. Por ello, evaluamos el inmunomarcador Ki67 de forma individual en los tres elementos celulares que componen el nefroblastoma. Todos los casos mostraron algún grado de proliferación. Los elementos celulares blastematosos presentaron frecuentemente alto índice de proliferación celular, seguidos por los elementos celulares de diferenciación epitelial. Los componentes estromales exhibieron en todos los casos un bajo índice de proliferación celular, lo que indica que la actividad proliferativa de estos componentes es muy pobre. El índice de proliferación tumoral en el nefroblastoma no mostró ninguna relación con la expresión del resto de las moléculas estudiadas.

En resumen, en este estudio se han evaluado un grupo de moléculas de adhesión de la familia cadherina-catenina, así como un inmunomarcador de proliferación celular en un tumor renal pediátrico. Hemos encontrado que el perfil de expresión de estas moléculas se comporta de manera regular en los elementos celulares que conforman al nefroblastoma. En el caso de las cadherinas, se han evaluado dos miembros de esta familia: cadherina-P y cadherina-E; cadherina-P se ha expresado de manera pobre y, predominantemente, en el citoplasma de las células de diferenciación epitelial, así como en la región nuclear; cadherina-E, por su parte, mostró inmunoexpresión en la membrana celular de las células blastematosas y epiteliales, reactividad intracitoplásmica, y nula reactividad en los elementos estromales, además, dos casos mostraron expresión nuclear aberrante. Las cateninas alfa, gamma y p120 mostraron inmunorreacción intracitoplasmática principalmente en los elementos epiteliales. De otra parte,  $\beta$ -catenina presentó una inmunoexpresión más diversa siendo positiva tanto en la membrana celular de las células epiteliales, como en la región intracitoplasmática y en la región nuclear de los tres elementos del nefroblastoma. En la región nuclear,  $\beta$ -catenina resultó positiva en 5, 3 y dos casos en los elementos epitelial, blastemal y estromal, respectivamente. La expresión fenotípica diversa en esta molécula indica su función como molécula de adhesión; sin embargo, la acumulación nuclear es la expresión de desregulación de esta proteína. En general, la inmunoexpresión e inmunolocalización del grupo de cadherinas–cateninas resultó homogénea con resultados similares a los encontrados en la literatura; no obstante, son necesarios más

estudios para entender mejor la función que este grupo selecto de moléculas tiene en el origen y evolución del nefroblastoma.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

**PRIMERA.** En general, las moléculas de adhesión del grupo cadherina-catenina se expresaron predominantemente en la región lateral de las membranas celulares y el citoplasma de los componentes epitelial y blastematoso.

**SEGUNDA.** La expresión de las moléculas de adhesión del grupo cadherina-catenina exhibió muy pobre reactividad en el componente estromal del nefroblastoma.

**TERCERA.** Beta-catenina mostró inmunoreactividad en las regiones subcelulares membranosa, citoplasmática y nuclear de los tres elementos celulares del nefroblastoma, pero fue predominante en la membrana y el citoplasma de los componentes celulares epiteliales y blastemales.

**CUARTA.** Cadherina-E se expresó predominantemente en la membrana de los componentes blastemal y epitelial, el borde apical de las células epiteliales mostro expresión aberrante.

**QUINTA.** La inmunorreactividad membranosa de cadherina-E no mostró tener relación con la expresión citoplasmática de las moléculas de adhesión del grupo de las cateninas.

**SEXTA.** Aunque en muy escasa cantidad, se observó expresión nuclear aberrante en todas las moléculas del grupo cadherina-catenina en el nefroblastoma.

**SÉPTIMA.** La expresión del biomarcador Ki67 determinó un alto índice de proliferación celular en los tumores cuyo componente celular predominante es el blastemal. Por el contrario, se documentó bajo índice de proliferación celular cuando el componente estromal es predominante.



## **RESUMEN**

## RESUMEN

El nefroblastoma es el tumor renal pediátrico más frecuente, las características fenotípicas así como su biología molecular están estrechamente relacionadas con el desarrollo renal; aunque la mayoría de estos tumores son de tipo esporádico, existen algunos casos en los que su presentación está asociada a malformaciones sindrómicas que predisponen a estos pacientes al desarrollo de este peculiar tumor maligno. Tanto las características fenotípicas como las moleculares son heterogéneas y en la actualidad se han descrito un grupo de genes, incluyendo activación mutacional en CTNNB1, que están involucrados en el desarrollo de este tumor. Sin embargo, estos cambios genéticos explican solamente un tercio de los casos de nefroblastoma esporádico por lo que es necesario el estudio de nuevos genes que ayuden a determinar la etiología del resto de los casos. En este estudio, se ha evaluado un grupo de 45 casos de nefroblastoma. Se realizaron nuevas preparaciones teñidas con hematoxilina y eosina de todos los casos y se analizaron para corroborar el diagnóstico de nefroblastoma y, así, poder escoger el material adecuado para ser sometido a estudio. Todos los casos mostraron la histología trifásica que se describe en los nefroblastomas clásicos, cada uno de los componentes celulares tumorales estuvo presente en diferentes proporciones.

La mayoría de los nefroblastomas estudiados (44) fueron de histología favorable y sólo un caso exhibió los hallazgos típicos de la histología desfavorable descritos en el nefroblastoma (gigantismo nuclear y mitosis multipolares). El patrón blastemal fue el que más predominó (53,3%) seguido por el patrón epitelial (31,1%), el cual estaba representado por túbulos en diferentes grados de maduración, así como por presencia de estructuras papilares y estructuras glomeruloides muy semejantes a lo observado en el riñón en desarrollo. El tercer patrón de crecimiento en orden de frecuencia fue el estromal (15,6%), representado por tejido desde fibroso inmaduro hasta músculo estriado esquelético. Este estudio ha investigado una serie de moléculas del sistema de adhesión celular cadherina-beta-catenina, así como el índice de proliferación celular mediante el inmunomarcador Ki67. La valoración de Ki 67 fue interpretada de manera independiente en cada uno de los componentes tumorales. Toda la serie de casos expresó el inmunomarcador Ki67 en al menos uno de los patrones de crecimiento; el blastema, el cual representa la parte más inmadura del nefroblastoma, fue el que más frecuentemente exhibió positividad mostrando tanto bajo como alto índice de proliferación celular. Así mismo, el patrón epitelial reveló positividad pero sólo con alto índice de

proliferación celular. Los patrones estromales en sus diferentes aspectos histológicos presentaron negatividad para Ki 67 en la mayoría de los casos y, cuando éste fue positivo, lo hizo con un índice bajo de proliferación.

El estudio de las moléculas de adhesión se realizó mediante el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa con anticuerpos mono y policlonales utilizando un inmunoteñidor automatizado. Se han corrido seis moléculas de adhesión consistentes en Cadherina-P, Cadherina-E, alfa-Catenina, beta-Catenina, p120 y gama-Catenina. En cada caso, se ha utilizado tejido renal no neoplásico como control interno para valorar la calidad de cada una de las preparaciones y su correcta interpretación.

El epítipo cadherina-E, como era de esperar, mostró positividad membranosa predominantemente en el componente epitelial de los tumores estudiados, aunque esta expresión membranosa también se observó en el blastema; en ambos componentes, la expresión citoplásmica fue muy escasa lo cual es frecuente en las neoplasias de origen epitelial. El patrón estromal no mostró reactividad para cadherina-E. Curiosamente, cadherina-E se expresó con inmunolocalización nuclear en dos de los 45 casos estudiados (expresándose en el blastema y el estroma neoplásicos), este último fenómeno no es común en las neoplasias malignas. Del total de 45 casos estudiados para este epítipo, 24 casos fueron negativos en los tres componentes tumorales. La falta de expresión de cadherina-E significa pérdida total de la capacidad de las células para mantenerse unidas unas con otras y, por lo tanto, la ausencia de función normal de esta molécula promueve la invasión. Estos cambios denotan una posible desregulación de la expresión de cadherina-E, hallazgo ya conocido y que tiene estrecha relación con comportamientos más agresivos y con el desarrollo de metástasis tempranas en neoplasias malignas del adulto. En este estudio, la falta de expresión de cadherina-E no parece alterar la regulación de sus moléculas asociadas (alfa-catenina, beta-catenina, gama-catenina y p120), por lo que no se observó una estrecha relación entre la falta de expresión de cadherina-E y sus moléculas compañeras.

Por otro lado, cadherina-P se objetivó principalmente en la región citoplásmica del componente epitelial del nefroblastoma, mientras que el blastema y el estroma mostraron muy escasa expresión para este epítipo.

La expresión de las moléculas de adhesión alfa-catenina, gama-catenina, y p120 mostraron similares resultados. La mayoría de los casos que resultaron positivos para estas tres

moléculas de adhesión correspondieron a nefroblastoma con patrón de crecimiento epitelial e inmunolocalización citoplasmática de intensidad variable; pero también, se observó positividad en la membrana e incluso inmunolocalización nuclear.

Finalmente, beta-catenina mostró expresión heterogénea en los diferentes componentes de los nefroblastomas estudiados; sin embargo, este patrón de expresión es más o menos similar a lo previamente reportado en la literatura. En el presente estudio la expresión membranosa de beta-catenina ha sido notablemente la más frecuente entre los nefroblastomas estudiados, siendo el componente epitelial el que mostró este patrón de expresión para esta proteína. También se observó localización citoplasmática pero en menor cantidad. Interesantemente, 10 casos de nefroblastoma expresaron beta-catenina con localización nuclear; este hallazgo es ligeramente inferior a lo previamente reportado en la literatura mundial. La expresión nuclear de beta-catenina mediante estudio de inmunohistoquímica es un excelente método para detectar aquellos casos de nefroblastoma con inmunolocalización nuclear ya que esta característica es la que ha sido estrechamente relacionada con el desarrollo de este tumor renal infantil.

## SUMMARY



## SUMMARY

Nephroblastoma is the most frequent pediatric kidney tumor of infancy; its phenotypic features along with its molecular biology are tightly related to nephrogenesis. Although the vast majority of these tumors are sporadic, there are some cases on which the pathologic presentation is related to syndromic malformations that predispose these patients to developing such particular malignant tumor. The histology and molecular pathology of Nephroblastoma is heterogeneous, and to date a group of genes have been related to the developing of this neoplasm, including mutations on CTNNB1 gene.

These genetic changes accounts for only one third of cases of sporadic Nephroblastoma, therefore it is necessary to search for new genes that help to clarify the etiology of the remaining genetic changes not yet identified. A set of 45 Nephroblastomas have been explored. For this purpose we have evaluated Hematoxylin and Eosin sections of all cases in order to confirm the diagnosis of Nephroblastoma as well as to evaluate the paraffin block tissue adequacy. All cases showed the classical triphasic histology; also each case displayed the three patterns in different percentages.

The vast majority of tumors (44) were of favorable histology and only one case showed the typical features of unfavorable histology of Nephroblastoma (huge nuclei and multipolar mitosis). Among all cases, blastemal pattern was the most frequent (53.3%) following by epithelial elements (31.1%) which were represented by tubules with different stages of maturation, as well as papillary and glomeruloid structures that resemble the developing kidney.

In order of frequency, the stromal component was the third pattern of growing (15.6%); Stromal pattern showed immature fibrous tissue and skeletal muscle. On this study we have evaluated a set of molecules related to the cadherin-catenin adhesion system. Also the proliferative index was evaluated using the Ki67 marker. The evaluation of Ki 67 marker was individually performed on each component of Nephroblastoma. All cases showed positivity for Ki 67 marker in at least one of the histological patterns. Blastema, which represents the most immature element, was positive in most cases, disclosing high index and low index of cellular proliferation. Also the epithelial pattern showed positivity for Ki 67 but only with a high index of proliferation. Most of stromal patterns of growing were negative and when this pattern

showed positivity, the index of proliferation was low. This study was performed with an immunohistochemical peroxidase-streptavidin-biotin assay, using mono and polyclonal antibodies. The assay was completed by an automatic immunostainer. Six adhesion molecules were evaluated (e-cadherin, p-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin and p120). Each case was matched with normal kidney tissue in order to evaluate adequacy of the immunohistochemistry technique.

As expected, E-cadherin showed membranous positivity mainly on the epithelial component, although membranous expression was also observed on blastemal elements: in both components the intracytoplasmic was poor and weak, as seen on carcinomas. Stromal pattern was negative for cadherin-E. Remarkably, E-cadherin showed nuclear immunolocalization in 2 of the 45 cases (blastemal and stromal component one case each), this phenomenon is uncommon in malignant neoplasm. Of the 45 cases evaluated for cadherin-E, 24 cases were negative. The lack of expression of E-cadherin causes an absence of capacity for bounding cell together and as a result this phenomenon promotes the ability of malignant cells to invade the surrounding tissues. These changes denote a possible deregulation of cadherin expression. This finding is already known as a feature of adult malignant neoplasm for aggressive behavior and the developing of early metastasis. On this study the lack of expression of E-cadherin seems not to modify the regulation of the remaining related adhesion molecules (alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin and p120), there is no relationship between the lack of expression of e-cadherin and its adhesion molecules partners.

In the other hand, P-cadherin expression was seen mainly in the intracytoplasmic location of the epithelial component, whereas the blastemal and stromal patterns showed a very poor expression for this protein.

Alpha-catenina, gamma-catenin and p120 expression was very similar. The three molecules were positive with variable intensity on the intracytoplasmatic region of epithelial pattern of the evaluated Nephroblastomas. Furthermore a few cases were positive with nuclear localization.

Beta-catenin has shown heterogeneous expression at different levels; however this pattern of expression is very similar if compared with previous observations. On this study the membranous expression of beta-catenin has been remarkable among all the cases evaluated, the positivity of epithelial pattern was the most frequently seen. Beta-catenin reactivity on the

intracytoplasmatic region was also observed although in a lesser quantity. It is of interest that nuclear immunolocalization was seen in 10 cases. This finding is similar to the observed in previous studies. Nuclear immunolocalization of beta-catenin using immunohistochemical technique is a useful tool for detecting those cases of Nephroblastomas under suspicion of carrying mutations on CTNNB1. Due to CTNNB1 has been involved in the developing of this kidney tumor of childhood.

## REFERENCIAS

1. **Aberle H, Bauer A, Stappert J.** beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 1997;16:3797-804.
2. **Akiyama T.** Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:273-282.
3. **Alami J, Williams BR, Yeger H.** Differential expression of E-cadherin and b catenin in primary and metastatic Wilms's tumours *J Clin Pathol* 2003;56:218-225.
4. **Alattia JR, Kurokawa H, Ikura M.** Structural view of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:359-367.
5. **Alexander N, Wong CS, Pignatelli M.**  $\beta$ -Catenin—A linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002;160:389-401.
6. **Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC, Picard JY, Xavier F.** Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of  $\beta$ -catenin. *Development* 2000;127: 3349-3360.
7. **Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Pérez-Gómez B, Palacios J, Pollán M, Linares J, Serrano S, Sáez-Castillo AI, Sánchez L, Pajares R, Sánchez-Aguilera A, Artiga MJ, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL.** A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* 2007;67:3450-3460.
8. **Ananthakrishnan R, Ehrlicher A.** The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci* 2007;3:303-317.
9. **Anastasiadis PZ, Reynolds AB.** The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* 2000;113:1319-1334.
10. **Banziger C, Soldini D, Schutt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K.** Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 2006; 125:509-522.
11. **Barbosa AS, Hadjiathanasiou ChG, Theodoridis Ch, Papath-anasiou A, Tar A, Merksz M, Györfvári B, Sultan Ch, Dumas R, Jaubert F, Niaudet P, Moreira-Filho CA, Cotinot C, Fellous M.** The same mutation affecting the splicing of WT1 gene is present on frasier syndrome patients with or without Wilms' Tumor. *Hum Mut* 1999; 13:146-153.
12. **Bard JB.** A bioinformatics approach to investigating developmental pathways in the kidney and other tissues. *Int J Dev Biol* 1999;4:397-403.
13. **Barker N, Clevers H.** Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays* 2000;22:961-965.
14. **Barth AIM, Ithke ISN, Nelsont WJ.** Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:683-690.
15. **Beavon IRG.** The E-cadherin $\pm$ catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000;36:1607-1620
16. **Beckwith JB.** Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. *Am J Med Genet* 1998;79:268-273.
17. **Behrens J, Lustig B.** The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 2004;48:477-487.
18. **Ben-Ze'ev A, Geiger B.** Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:629-639.
19. **Benzing T, Simons M, Walz G.** Wnt signaling in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1389-1398.
20. **Biris KK, Dunty WC Jr, Yamaguchi TP.** Mouse Ripply2 is downstream of Wnt3a and is dynamically expressed during somitogenesis. *Dev Dyn* 2007;236:3167-3172.
21. **Boller K, Vestweber D, Kemler R.** Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 1985;100:327-332.
22. **Boras-Granic K, Wyslomerski JJ.** Wnt signaling in breast organogenesis. *Organogenesis* 2008;4:116-22.
23. **Braga VM.** Cell-cell adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:546-556.
24. **Brannon M, Gomperts M, Sumoy L, Moon RT, Kimelman D.** A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev* 1997;11:2359-2370.
25. **Brown KW, Malik KTA.** The molecular biology of Wilms' tumour. *Expert Rev Mol Med* 2001;3:1-16.
26. **Calvisi DF, Factor VM, Loi R, Thorgeirsson SS.** Activation of beta-catenin during Hepato-carcinogenesis in transgenic mouse models: relationship to phenotype and tumor grade. *Cancer Res* 2001;61:2085-2091.



27. **Castano J, Raurell I, Piedra JA, Miravet S, Dunach M, Garcia de Herreros A.** Beta-catenin N- and C-terminal tails modulate the coordinated binding of adherens junction proteins to beta-catenin. *J Biol Chem* 2002;277:31541-31550.
28. **Charles AK, Brown KW, Berry PJ.** Microdissecting the genetic events in nephrogenic rests and Wilms' tumor development. *Am J Pathol* 1998;153:991-1000.
29. **Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ.** p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* 2003;163:547-557.
30. **Chen YT, Stewart DB, Nelson WJ.** Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basolateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 1999;144:687-699.
31. **Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C.** Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008;40:577-594.
32. **Chung GG, Provost E, Kielhorn EP, Charette LA, Smith BL, Rimm DL.** Tissue microarray analysis of  $\beta$ -catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho-beta-catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* 2001;7: 4013-4020.
33. **Clements WM, Wang J, Sarnaik A, Kim OJ, MacDonald J, Fenoglio-Preiser C, Groden J, Lowy AM.**  $\beta$ -Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res* 2002;62:3503-3506.
34. **Collu GM, Brennan K.** Cooperation between Wnt and Notch signalling in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007;9:105.
35. **Coppes MJ, Campbell CE, Williams BR.** The role of WT1 in Wilms tumorigenesis. *FASEB J* 1993;10:886-895.
36. **Cowin P.** Unraveling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10759-10761.
37. **Cox RT, Kirkpatrick C, Peifer M.** Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during Drosophila embryogenesis. *J Cell Biol* 1996;134:133-148.
38. **Dahl U, Sjödin A, Larue L, Radice GL, Cajander S, Takeichi M, Kemler R, Semb H.** Genetic dissection of cadherin function during nephrogenesis. *Mol Cell Biol* 2002;22:1474-1487.
39. **Dajani R, Fraser E, Roe SM, Yeo M, Good VM, Thompson V, Dale TC, Pearl LH.** Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J* 2003;22:494-501.
40. **Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Martinez Leal JF, Zhurinsky J, Geiger B, Oren M.** Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *Cancer Res* 2000;60:6611-6616.
41. **D'Angelo MF, Kausik SJ, Sebo TJ, Rathbun SR, Kramer SA, Husmann DA.** Immuno-histochemical expression of P53 protein in histologically favorable Wilms tumor and its relationship to tumor stage at presentation. *J Urol* 2003;169:1815-1817.
42. **Daugherty RL, Gottardi CJ.** Phosphoregulation of beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology* 2007;22:303-309.
43. **Davies JA, Perera AD, Walker CL.** Mechanisms of epithelial development and neoplasia in the metanephric kidney. *Int J Dev Biol* 1999;43:473-478.
44. **Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB.** A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 2003;163:525-534.
45. **De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF, Mayor R.** Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* 2005;132:2587-2597.
46. **De Langhe SP, Reynolds SD.** Wnt signaling in lung organogenesis. *Organogenesis* 2008;4:100-108.
47. **De Robertis EM, Larrain J, Oelgeschlager M, Wessely O.** The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat Rev Genet* 2000;1:171-181.
48. **Demunter A, Libbrecht L, Degreef H, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ.** Loss of membranous expression of  $\beta$ -catenin is associated with tumor progression in cutaneous melanoma and rarely caused by exon 3 mutations. *Mod Pathol* 2002;15:454-461.
49. **Deutscher E, Hung-Chang Yao H.** Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Müllerian duct morphogenesis. *Dev Biol* 2007;307:227-236.
50. **Dome JS, Coppes MJ.** Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr*

- 2002;14:5-11.
51. **Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis, WI.** Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 2005;123:903-915.
52. **Dressler GR.** The genetic control of renal development. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;4:253-257.
53. **Dressler GR, Woolf AS.** Pax2 in development and renal disease. *Int J Dev Biol* 1999;43:463-468.
54. **Eberhart CG, Argani P.** Wnt signaling in human development: beta-catenin nuclear translocation in fetal lung, kidney, placenta, capillaries, adrenal, and cartilage. *Pediatr Dev Pathol* 2001;4:351-357.
55. **Ehrlich D, Bruder E, Thome M, Gutt C, von Knebel Doeberitz M, Niggli F, Perantoni A, Bode M, Koesters R.** Nuclear accumulation of beta-catenin protein indicates frequent activation of Wnt-signaling in chemically-induced rat nephroblastomas. *Pediatr Dev Pathol* 2009;6:1.
56. **Eliceiri BP, Cheresch DA.** Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:563-568.
57. **Fagotto F, Funayama N, Gluck U, Gumbiner B.** Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* 1996;132: 1105-1114.
58. **Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM.** Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol* 1998;8:181-190.
59. **Farr GH 3rd, Ferkey DM, Yost C, Pierce SB, Weaver C, Kimelman D.** Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in *Xenopus* axis specification. *J Cell Biol* 2000;148:691-702.
60. **Frame S, Cohen P.** GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001;359:1-16.
61. **Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, Hurtado C, Kuroda H, Pera EM, De Robertis EM.** Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 2007;131:980-993.
62. **Fuerer C, Nusse R, Ten Berge D.** Wnt signalling in development and disease. Max Delbrück Center for Molecular Medicine meeting on WNT signalling in Development and Disease. *EMBO Rep* 2008;9:134-138.
63. **Fujimori M, Ikeda S, Shimizu Y, Okajima M, Asahara T.** Accumulation of beta-catenin protein and mutations in exon 3 of beta-catenin gene in gastrointestinal carcinoid tumor. *Cancer Res* 2001;61:6656-6659.
64. **Fukuzawa R, Anaka MR, Weeks RJ, Morison IM, Reeve AE.** Canonical WNT signalling determines lineage specificity in Wilms tumour. *Oncogene* 2009;28:1063-1075.
65. **Fukuzawa R, Heathcott RW, Sano M, Morison IM, Yun K, Reeve AE.** Myogenesis in Wilms' tumors is associated with mutations of the WT1 gene and activation of Bcl-2 and the Wnt signaling pathway. *Pediatr Dev Pathol* 2004;7:125-137.
66. **Gamallo C, Moreno-Bueno G, Sarrió D, Calero F, Hardisson D, Palacios J.** The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14:650-654.
67. **Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suárez A, Armas A.**  $\beta$ -Catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas relationship with b-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol* 1999;155:527-536.
68. **Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M, Cano A.** Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1993;142:983-987.
69. **Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G.**  $\beta$ -Catenin dysregulation in thyroid neoplasms down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 2001;158:987-996.
70. **Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z.** Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:537-545.
71. **Gavard J, Mège RM.** Once upon a time there was beta-catenin in cadherin-mediated signalling. *Biol Cell* 2005;97:921-926.
72. **Gerstein AV, Almeida TA, Zhao G, Chess E, Shih IeM, Buhler K, Pienta K, Rubin MA, Vessella R, Papadopoulos N.** APC/CTNNB1 ( $\beta$ -catenin) pathway alterations in human prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:9-16.
73. **Glassberg KI.** Nomal and abnormal development of the kidney: a clinicians's interpretation of the current knowledge. *J Urol*

- 2002;167:2339-2351-
74. **Godin RE, Robertson EJ, Dudley AT.** Role of BMP family members during kidney development. *Int J Dev Biol* 1999;43:405-411.
  75. **Goichberg P, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Geiger B.** Recruitment of  $\beta$ -catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction. *J Cell Sci* 2001;114:1309-1319.
  76. **Gooding JM, Yap KL, Ikura M.** The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays* 2004;26:497-511.
  77. **Gordon MD, Nusse R.** Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006;281: 22429-22433.
  78. **Gottardi CJ, Gumbiner BM.** Adhesion signaling: how  $\beta$ -catenin interacts with its partners. *Curr Biol* 2001;11:R792-R794.
  79. **Gottardi CJ, Gumbiner BM.** Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 2004;167:339-349.
  80. **Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM.** E-Cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting  $\beta$ -catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 2001;53:1049-1059.
  81. **Gregorieff A, Clevers H.** Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005;15:877-890.
  82. **Guertl B, Ratschek M, Harms D, Jaenig U, Leuschner I, Poremba C, Hoeffler G.** Clonality and loss of heterozygosity of WT genes are early events in the pathogenesis of nephroblastomas. *Hum Pathol* 2003;34:278-281.
  83. **Gumbiner BM.** Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:622-634.
  84. **Gwin K, Cajas MM, Caminoa-Lizarralde A, Picazo ML, Nistal M, Reyes-Múgica M.** Expanding the clinical spectrum of Frasier syndrome. *Pediatr Dev Pathol* 2008;11:122-127.
  85. **Hadjihannas MV, Bruckner M, Jerchow B, Birchmeier W, Dietmaier W, Behrens J.** Aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2000;103:10747-10752.
  86. **Hajra KM, Fearon ER.** Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes, Chromosomes Cancer* 2002;34:255-268.
  87. **Hameed O, Klein MJ.** WTX, A presumed tumor suppressor gene, is commonly inactivated in sporadic nephroblastoma. *Adv Anat Pathol* 2007;14:234.
  88. **Harrington MJ, Hong E, Fasanmi O, Brewster R.** Cadherin-mediated adhesion regulates posterior body formation. *BMC Dev Biol* 2007;7:130.
  89. **Harrington KJ, Syrigos KN.** The role of E-cadherin-catenin complex: more than an intercellular glue?. *Ann Surg Oncol* 2000;7:783-788.
  90. **Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P.** Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3  $\beta$ . *Curr Biol* 1998;8:573-581.
  91. **Harwood A Coates JC.** A prehistory of cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:470-476.
  92. **Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, Heck R, Jiang W, Zhou L, Feng T, King D, Cheng H, Breyer B, Peabody T, Simon MA, Montag AG, HE TCh.** Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the  $\beta$ -catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 2002;102:338-342.
  93. **Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R.** The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* 2000;19:1839-1850.
  94. **Hirohashi S, Kanai Y.** Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003;94:575-581.
  95. **Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, Ogura S, Kinoshita I, Shimizu M, Moriuchi T, Katoh H, Nishimura M, Dosaka-Akita H.** Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer* 2002;94:3752-3758.
  96. **Horster MF, Braun GS, Huber SM.** Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev* 1999;79:1157-1191.
  97. **Howe LR, Brown AM.** Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2004;3:36-41.
  98. **Hsueh C, Wang H, Gonzalez-Crussi F, Lin JN, Hung IJ, Yang CP, Jiang TH.** Infrequent p53 gene mutations and lack of p53 protein expression in clear cell sarcoma of the kidney: immunohistochemical study and mutation

- analysis of p53 in renal tumors of unfavorable prognosis. *Mod Pathol* 2002;15:606-610.
99. **Huang H, He X.** Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol* 2008;20:119-125.
  100. **Huber AH, Nelson WJ, Weis WI.** Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 1997;90:871-882.
  101. **Huelsken J, Behrens J.** The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2002;115:3977-3978.
  102. **Huff V.** Wilms tumor genetics. *Am J Med Gen* 1998;79:260-267.
  103. **Hülsken J, Birchmeier W, Behrens J.** E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994; 127:2061-2069.
  104. **Iglesias DM, Hueber PA, Chu L, Campbell R, Patenaude AM, Dziarmaga AJ, Quinlan J, Mohamed O, Dufort D, Goodyer PR.** Canonical WNT signaling during kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:494-500.
  105. **Ikeda S, Kishida M, Matsuura Y, Usui H, Kikuchi A.** GSK-3beta-dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene* 2000;27:537-545.
  106. **Inagawa S, Itabashi M, Adachi S, Kawamoto T, Hori M, Shimazaki J, Yoshimi F, Fukao K.** Expression and prognostic roles of  $\beta$ -Catenin in hepatocellular carcinoma: correlation with tumor progression and postoperative survival. *Clin Cancer Res* 2002;8:450-456.
  107. **Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DK, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F, Reynolds AB.** A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 2002;159:465-476.
  108. **Itoh K, Brott BK, Bae GU, Ratcliffe MJ, Sokol SY.** Nuclear localization is required for Dishevelled function in Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol* 2005;4:3
  109. **Jankowski JA, Bruton R, Shepherd N, Sanders DS.** Cadherin and catenin biology represent a global mechanism for epithelial cancer progression. *Mol Pathol* 1997;50:289-290.
  110. **Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo ChK, Freund JN, Costantini F.** Wnt/beta-Catenin/Tcf signaling induces the transcription of axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2002;22:1172-1183.
  111. **Jin T, Fantus IG, Sun J.** Wnt and beyond WNT: Multiple mechanisms control the transcriptional property of  $\beta$ -catenin. *Cell Signal* 2008;20:1697-1704.
  112. **Kanwar YS, Wada J, Lin S, Danesh FR, Chugh SS, Yang O, Banerjee T, Lomasney JW.** Update of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:202-215.
  113. **Katoh M, Katoh M.** WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007;13:4042-4045.
  114. **Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stanek P, Niehrs C, Wu W.** R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Dev Cell* 2004;7:525-534.
  115. **Kerr NJ, Fukuzawa R, Reeve AE, Sullivan MJ.** Beckwith-Wiedemann syndrome, pancreatoblastoma, and the Wnt signaling pathway. *Am J Pathol* 2002;160:1541-1542.
  116. **Kielhorn E, Provost E, Olsen D, D'aquila TG, Smith BL, Camp RL, Rimm DL.** Tissue Microarray-based analysis shows phospho-beta-catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. *Int J Cancer* 2003;103:652-656.
  117. **Kim E, Arnould T, Sellin LK, Benzing T, Fani MJ, Grüning W, Sokoli SY, I Drummond, Walz G.** The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J Biol Chem* 1999;274:4947-4953.
  118. **Kim K, Pang KM, Evans M, Hay ED.** Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol Biol Cell* 2000; 11:3509-3523.
  119. **Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A.** Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;251:1366-1370.
  120. **Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ.** Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol* 1995;130:67-77.
  121. **Kobielak A, Fuchs E.** Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin

- dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:614-625.
122. Koesters R, Niggli F, von Knebel Doeberitz M. Nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin protein in Wilms' tumours. *J Pathol* 2003;199:68-76.
  123. Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, Briner J von Knebel Doeberitz M. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res* 1999;59:3880-3882.
  124. Kolligs FT, Bommer G, Göke B. Wnt/Beta-catenin/Tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 2002; 66:131-144.
  125. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008;4:68-75.
  126. Koseki C, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Apoptosis in metanephric development. *J Cell Biol* 1992;19:1327-1333.
  127. Kroschewski R. Molecular mechanisms of epithelial polarity: about shapes, forces, and orientation problems. *News Physiol Sci* 2004;19:61-66.
  128. Kuhnen C, Herter P, Müller O, Muehlberger T, Krause L, Homann H, Steinau HU, Müller KM.  $\beta$ -Catenin in soft tissue sarcomas: expression is related to proliferative activity in high-grade sarcomas. *Mod Pathol* 2000;13: 1005-1013.
  129. Kusafuka T, Miao J, Kuroda S, Udatsu Y, Yoneda A. Codon 45 of the  $\beta$ -catenin gene, a specific mutational target site of Wilms' tumor. *Int J Mol Med* 2002;10:395-399.
  130. Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, Bell J, Frayling I, Efstathiou J, Pack K, Payne S, Roylance R, Gorman P, Sheer D, Neale K, Phillips R, Talbot I, Bodmer W, Tomlinson I. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous-polypsis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med* 1999;5:1071-1075.
  131. Leckband D, Sivasankar S. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:587-592.
  132. Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 2001;264:74-99.
  133. Lee E, Salic A, Kirschner MW. Physiological regulation of beta-catenin stability by Tcf3 and CK1epsilon. *J Cell Biol* 2001;154:983-993.
  134. Lehtonen S, Lehtonen E, Olkkonen VM. Vesicular transport and kidney development. *Int J Dev Biol* 1999;43:425-433.
  135. Li CM, Guo M, Borczuk A, Powell CA, Wei M, Thaker HM, Friedman R, Klein U, Tycko B. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* 2002;160:2181-2190.
  136. Li CM, Kim CE, Margolin AA, Guo M, Zhu J, Mason JM, Hensle TW, Murty VV, Grundy PE, Fearon ER, D'Agati V, Licht JD, Tycko B. CTNNB1 mutations and overexpression of Wnt/beta-catenin target genes in WT1-mutant Wilms' tumors. *Am J Pathol* 2004;165:1943-1953.
  137. Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH, 3rd, Sussman DJ, Jonkers J, Kimelman D, Wu D. Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J* 1999;18:4233-4240.
  138. Li L, Yuan H, Xie W, Mao J, Caruso AM, McMahon A, Sussman DJ, Wu D. Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* 1999; 274:129-134.
  139. Liu C, Kato Y, Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates Xenopus axis formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6273-6278.
  140. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
  141. Luo W, Lin SC. Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals* 2004;13:99-113.
  142. Luu HH, Zhang R, Haydon RC, Rayburn E, Kang Q, Si1 W, Park JK, Wang H, Peng Y, Jiang W, He TCh. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway as novel cancer Drug targets. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:653-671.
  143. Maher ER, Reik EW. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 2000;105:247-252.
  144. Maiti S, Alam R, Amos ChI, Huff V. Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res* 2000;60:6288-6292.
  145. Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, Biechele TL, Gingras AC, Zheng N, Maccoss MJ, Angers



- S, Moon RT. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* 2007;316:1043-1046.
146. Maschietto M, de Camargo B, Brentani H, Grundy P, Sredni ST, Torres C, Mota LD, Cunha IW, Patrão DF, Costa CM, Soares FA, Brentani RR, Carraro DM. Molecular profiling of isolated histological components of wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. *Oncology* 2008;75:81-91.
  147. Masui O, Ueda Y, Tsumura A, Koyanagi M, Hijikata M, Shimotohno K. RelA suppresses the Wnt/beta-catenin pathway without exerting trans-acting transcriptional ability. *Int J Mol Med* 2002;9:489-493.
  148. McCartney BM, Price MH, Webb RL, Hayden MA, Holot LM, Zhou M, Bejsovec A, Peifer M. Testing hypotheses for the functions of APC family proteins using null and truncation alleles in *Drosophila*. *Development* 2006 133:2407-2418.
  149. McKay RM, Peters JM, Graff JM. The casein kinase I family in Wnt signaling *Dev Biol* 2001;235, 388-396.
  150. Mendiola M, Barriuso J, Mariño-Enríquez A, Redondo A, Domínguez-Cáceres A, Hernández-Cortés G, Pérez-Fernández E, Sánchez-Navarro I, Fresno Vara JA, Suárez A, Espinosa E, González-Barón M, Palacios J, Hardisson D. Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2009;40:631-638.
  151. Mendiola M, Barriuso J, Redondo A, Mariño-Enríquez A, Madero R, Espinosa E, Vara JA, Sánchez-Navarro I, Hernández-Cortés G, Zamora P, Pérez-Fernández E, Miguel-Martín M, Suárez A, Palacios J, González-Barón M, Hardisson D. Angiogenesis-related gene expression profile with independent prognostic value in advanced ovarian carcinoma. *PLoS One* 2008;3:e4051.
  152. Menke A, McInnes L, Hastie ND, Schedl A. The Wilms' tumor suppressor WT1: approaches to gene function. *Kidney Int* 1998;53:1512-1518.
  153. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 2006;25:7461-7468.
  154. Montgomery E, Lee J H, Abraham S, Wu T. Superficial fibromatoses are genetically distinct from deep fibromatoses. *Mod Pathol* 2001;14:695-701.
  155. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrio D, Sanchez C, Cassia R, Prat J, Herman JG, Esteller M, Matias-Guiu X, Palacios J. Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol* 2003;199:471-478.
  156. Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999;21:1021-1030.
  157. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-1790.
  158. Munemitsu S, Albert I, Suoza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc. Nati. Acad. Sci* 1995;92:3046-3050.
  159. Nakamoto K, Kuratsu J, Ozawa M. Beta-catenin cleavage in non-apoptotic cells with reduced cell adhesion activity. *Int J Mol Med* 2005;15:973-9.
  160. Nakatani Y, Masudo K, Miyagi Y, Inayama Y, Kawano N, Tanaka Y, Kato K, Ito T, Kitamura H, Nagashima Y, Yamanaka S, Nakamura N, Sano J, Ogawa N, Ishiwa N, Notohara K, Resl M, Mark EJ. Aberrant Nuclear Localization and Gene Mutation of  $\beta$ -catenin in Low-Grade Adenocarcinoma of Fetal Lung, Type: Up-Regulation of the Wnt Signaling Pathway. *Mod Pathol* 2002;15:617-624.
  161. Nejak-Bowen K, Monga SP. Wnt/b-catenin signaling in hepatic Organogenesis. *Organogenesis* 2008;4:92-99.
  162. Ng TL, Gown AM, Barry TS, Cheang MC, Chan AK, Turbin DA, Hsu FD, West RB, Nielsen TO. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol* 2005;18:68-74.
  163. Nishita M, Yoo SK, Nomachi A, Kani S, Sougawa N, Ohta Y, Takada S, Kikuchi A, Minami Y. Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol* 2006;175:555-62.
  164. Nistal M, Rodríguez JI, García-Fernández E, Cajaiba MM, Reyes-Múgica M. Fetal gonadoblastoid testicular dysplasia: a focal failure of testicular development. *Pediatr Dev Pathol* 2007;10:274-281.
  165. Nollet F, Berx G, van Roy F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999;2:77-85.

166. Nusse R. Cell biology: relays at the membrane. *Nature* 2005;438:747-749.
167. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005;15:28-32.
168. Nusse R. Cancer. Converging on beta-catenin in Wilms tumor. *Science* 2007;316:988-989.
169. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res* 2008;18:523-527.
170. Nusse R, Fuerer C, Ching W, Harnish K, Logan C, Zeng A, Ten Berge D, Kalani Y. Wnt Signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008;73:59-66.
171. Oloumi A, McPhee T, Dedhar S. Regulation of E-cadherin expression and h-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta* 2004;1691:1-15.
172. Omholt K, Platz A, Ringborg U, Hansson J. Cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer* 2000;92:839-842.
173. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. Serine phosphorylation regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 1997;272:24735-24738.
174. Ostrom L, Tang MJ, Gruss P, Dressler GR. Reduced *Pax2* gene dosage increases apoptosis and slows the progression of renal cystic disease *Dev Biol* 2000;219:250-258.
175. Owen C, Virappane P, Alikian M, Stasevich I, Summers K, Lillington D, Bonnet D, Burnett A, Mills K, Lister TA, Fitzgibbon J. WTX is rarely mutated in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2008;93:947-948.
176. Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 1989;8:1711-1717.
177. Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4246-4250.
178. Park JI, Ji H, Jun S, Gu D, Hikasa H, Li L, Sokol SY, McCrea PD. Frd3 links Dishevelled to the p120-catenin/Kaiso pathway: distinct catenin subfamilies promote Wnt signals. *Dev Cell* 2006;11:683-695.
179. Peiffer M, McCrea PD, Green KJ, Wieschaus E, Gumbiner BM. The vertebrate adhesive junction proteins  $\beta$ -catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* 1992;118:681-691.
180. Perez-Moreno M, Fuchs E. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell* 2006;11:601-612.
181. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-1851.
182. Pötter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev* 1999;20:207-239.
183. Provost E, Rimm DL. Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:567-572.
184. Provost E, Yamamoto Y, Lizardi I, Stern J, D'Aquila TG, Gaynor RB, Rimm DL. Functional correlates of mutations in beta-catenin in exon 3 phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2003;278:31781-31789.
185. Pulkkinen K, Murugan S, Vainio S. Wnt signaling in kidney development and disease. *Organogenesis* 2008;4:55-59.
186. Qi J, Wang J, Romanyuk O, Siu CH. Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* 2006;17:1261-1272.
187. Reeve AE, Sih SA, Raizis AM, Feinberg AP. Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells. *Mol Cell Biol* 1989;9:1799-1803.
188. Reid LH, West A, Gioeli DG, Phillips KK, Kelleher KF, Araujo D, Stanbridge EJ, Dowdy SF, Gerhard DS, Weissman BE. Localization of a tumor suppressor gene in 11p15.5 using the G401 Wilms' tumor assay. *Hum Mol Genet* 1996;5:239-247.
189. Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* 1994;14:8333-8342.
190. Ribes D, Fischer E, Calmont A, Rossert J. Transcriptional control of epithelial differentiation during kidney development. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:9-15.
191. Riggleman B, Wieschaus E, Schedl P. Molecular analysis of the armadillo locus:

- uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev* 1989;3:96-113.
192. Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8813-8817.
  193. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer* 2005;5:699-712.
  194. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M, Kim JC, Feinberg AP, Gerald WL, Vargas SO, Chin L, Iafrate AJ, Bell DW, Haber DA. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 2007;315:642-645.
  195. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Stone A, Burger A, Coffman EJ, Zhang J, Haber DA. The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:8338-8343.
  196. Rodriguez-Pinilla M, Rodriguez-Peralto JL, Hitt R, Sanchez JJ, Sanchez-Verde L, Alameda F, Ballestin C, Sanchez-Cespedes M. beta-Catenin, Nf-kappaB and FAS protein expression are independent events in head and neck cancer: study of their association with clinical parameters. *Cancer Lett* 2005;230: 141-148.
  197. Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:36734-36740.
  198. Rubinfeld B, Tice DA, Polakis P. Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* 2001;276:39037-39045.
  199. Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:461-470.
  200. Sadot E, Geiger B, Oren M, Ben-Ze'ev A. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol* 2001;21:6768-6781.
  201. Safford SD, Goyeau D, Freemerman AJ, Bentley R, Everett ML, Grundy PE, Skinner MA. Fine mapping of Wilms' tumors with 16q loss of heterozygosity localizes the putative tumor suppressor gene to a region of 6.7 megabases. *Ann Surg Oncol* 2003;10:136-143.
  202. Sainio K, Raatikainen-Ahokas A. Mesonephric kidney- a stem cell factory? *Int J Dev Biol* 1999;43:435-439.
  203. Sakamoto A, Oda Y, Adachi T, Saito T, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Beta-catenin accumulation and gene mutation in exon 3 in dedifferentiated liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1071-1078.
  204. Sakamoto J, Takata A, Fukuzawa R, Kikuchi H, Sugiyama M, Kanamori Y, Hashizume K, Hata JI. A novel WT1 gene mutation associated with wilms' tumor and congenital male genitourinary malformation. *Pediatr Res* 2001;50:337-344.
  205. Salahshor S, Woodgett JR. The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2005;58:225-236.
  206. San Miguel-Fraile P, Carrillo-Gijón R, Rodríguez-Peralto JL, Ortiz-Rey JA, Alvarez-Alvarez C, de la Fuente-Buceta A. DNA content and proliferative activity in pediatric genitourinary rhabdomyosarcoma. *Pediatr Pathol Mol Med* 2003;22:143-152.
  207. Sariola H, Saarman M. GDNF and its receptors in the regulation of the ureteric branching. *Int J Dev Biol* 1999;43:413-418.
  208. Sato H, Hasegawa, Kanai Y, Tsutsumi Y, Osamura Y, Abe Y, Sakai H, Hirohashi S. Expression of cadherins and their undercoat proteins( $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -catenins and p120) and accumulation of  $\beta$ -catenin with no gene mutations in synovial sarcoma. *Virchows Arch* 2001;438:23-30.
  209. Satoh Y, Nakadate H, Nakagawachi T, Higashimoto K, Joh K, Masaki Z, Uozumi J, Y Kaneko S, Mukai T, Soejima H. Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *Br J Cancer* 2006; 95:541-547.
  210. Saxén L. What is needed for kidney differentiation and how do we find it? *Int J Dev Biol* 1999;43:377-380.
  211. Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:518-525.
  212. Schulz S, Becker KF, Braungart E, Reichmuth R, Klamt B, Becker I, Atkinson M, Gessler M, Höfler. Molecular analysis of E-cadherin and cadherin-11 in Wilms'

- tumours. *J Pathol* 2000;191:162-169.
213. Schwartz DR, Wu R, Kardia SLR, Levin AM, Huang Ch, Shedden KA, Kuick R, Misek DE, Hanash SM, Taylor JMG, Reed H, Hendrix N, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR. Novel candidate targets of  $\beta$ -catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003;63:2913-2922.
  214. Scott JA, Yap AS. Cinderella no longer: alphacatenin steps out of cadherin's shadow. *J Cell Sci* 2006;119:4599-4605.
  215. Seifert JR, Mlodzik M. Frizzled/PCP signaling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 2007;8:126-138.
  216. Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 2001;11:592-585.
  217. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 2005;280:26770-26775.
  218. Seseke F, Thelen P, Heuser M, Zöller G, Ringert RH. Impaired nephrogenesis in rats with congenital obstructive uropathy. *J Urol* 2001;165:2289-2292.
  219. Shah S, Pishvaian MJ, Easwaran V, Brown PH, Byers SW. The role of cadherin, beta-Catenin, and AP-1 in retinoid-regulated carcinoma cell differentiation and proliferation. *J Biol Chem* 2002;277:25313-25322.
  220. Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hod T, Miyazawa K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M, Ito F. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 1995;128:949-957.
  221. Shibata R, Hashiguchi A, Sakamoto J, Yamada T, Umezawa A, Hata J. Correlation between a specific Wilms tumour suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumour (WT). *J Med Genet* 2002;39:83.
  222. Siu-Kwong C, Struh G. Evidence that armadillo transduces wingless by mediating nuclear export. *Cell* 2002;111:265-280.
  223. Sivasankaran R, Calleja M, Morata G, Basler K. The Wingless target gene Dfz3 encodes a new member of the Drosophila Frizzled family. *Mech Dev* 2000;91:427-431.
  224. Smolich BD, McMahon JA, McMahon AP, Papkoff J. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell* 1993;4:1267-1275.
  225. Solnica-Krezel L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr Biol* 2005;15:213-228.
  226. Staal FJ, Noort MvM, Strous GJ, Clevers HC. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep* 2002;3:63-68.
  227. Stanhope-Baker P, Williams BR. Identification of connective tissue growth factor as a target of WT1 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:38139-38150.
  228. Stewart F. Renal cancer genetics: von Hippel Lindau and other syndromes. *Int J Dev Biol* 1999;43:469-471.
  229. Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 2001;154: 1185-1196.
  230. Su MC, Huang WC, Lien HC. Beta-catenin expression and mutation in adult and pediatric Wilms' tumors. *APMIS* 2008;116:771-778.
  231. Svennilson J, Aperia A. Dopamine in the developing kidney. *Int J Dev Biol* 1999;43:441-443.
  232. Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci* 2007;104:293-302.
  233. Tanegashima K, Zhao H, Dawid IB. WGEF activates Rho in the Wnt-PCP pathway and controls convergent extension in Xenopus gastrulation. *EMBO J* 2008;27:606-617.
  234. Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2006;281:9971-9976.
  235. Tlsty TD. Cell-adhesion-dependent influences on genomic instability and carcinogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:647-653.
  236. Torbenson M, Lee JH, Choti M, Gage W, Abraham SC, Montgomery E, Boitnott J, Wu TT. Hepatic adenomas: analysis of sex steroid receptor status and the Wnt signaling pathway. *Mod Pathol* 2002;15:189-196.
  237. Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Sasaki Y, Murata N, Konishi Y. Mutations of adenomatous polyposis coli and beta-catenin genes during progression of lung tumors induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine in Rats.

- Can Res* 2001;61:6656-6659.
238. Tufro A, Norwood VF, Carey RM, Gomez RA. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2125-2134.
  239. Tycko B, Li CM, Buttyan R. The Wnt/beta-catenin pathway in Wilms tumors and prostate cancers. *Curr Mol Med* 2007;7:479-489.
  240. Vainio SJ. Nephrogenesis regulated by Wnt signaling. *J Nephrol* 2003;16:279-285.
  241. Vainio SJ, Itäranta PV, Peräsaari JP, Usitalo MS. Wnts as kidney tubule inducing factors. *Int J Dev Biol* 1999;43:419-423.
  242. van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, Mareel M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 2001;439:725-751.
  243. Van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, Van Roy F. Nuclear localization of the p120ctn Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7980-7985.
  244. van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, Destree O, Clevers H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 2002;277:17901-17905.
  245. Vasioukhin V, Fuchs E. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:76-84.
  246. Vuononvirta R, Sebire NJ, Dallosso AR, Reis-Filho JS, Williams RD, Mackay A, Fenwick K, Grigoriadis A, Ashworth A, Pritchard-Jones K, Brown KW, Vujanic GM, Jones C. Perilobar nephrogenic rests are non obligate molecular genetic precursor lesions of insulin-like growth factor-II-associated Wilms tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:7635-7644.
  247. Wedlich D. The polarising role of cell adhesion molecules in early development *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:563-568.
  248. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:509-514.
  249. White GRM, Kelsey AM, Varley JM, Birch JM. Somatic glypican 3 (GPC3) mutations in Wilms' tumour. *Br J Cancer* 2002;86:1920-1922.
  250. Widelitz RB. Wnt signaling in skin organogenesis. *Organogenesis* 2008;4:123-133.
  251. Wiener J, Coppes M, Ritchey ML. Current concepts in the biology of Wilms tumor. *J Urol* 1998;159:1316-1325.
  252. Wijnhoven BPL, Pignatelli M. E-cadherin-catenin: more than a "sticky " molecular complex. *Lancet* 1999;354:356-357.
  253. Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* 2006; 127:1027-1039.
  254. Willert K, Brink M, Wodarz A, Varmus H, Nusse R. Casein kinase 2 associates with and phosphorylates dishevelled. *EMBO J* 1997;16: 3089-3096.
  255. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 2006;20:1394-1404.
  256. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:95-102.
  257. Wong HC, Bourdellas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* 2003;12:1251-1260.
  258. Wong GT, Gavani BJ, McMahon AP. Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 1994;14:6278-6286.
  259. Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002;160:389-401.
  260. Woolf AS, Winyard PJ. Molecular mechanisms of human embryogenesis: developmental patho-genesis of renal tract malformations. *Pediatr Dev Pathol* 2002;5:108-129.
  261. Wright K, Wilson P, Morland S, Campbell I, Walsh M, Hurst T, Ward B, Cummings M, Chenevix-Trench G. Beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *Int J Cancer* 1999; 82:625-629.
  262. Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* 2003;163:535-545.
  263. Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 2005;123:889-



- 901.
264. Yamada Y, Oyama T, Hirose Y, Hara A, Sugie S, Yoshida K, Yoshimi N, Mori H. Beta-catenin mutation is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2003;24:91-97.
265. Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J* 2002;21:1733-1742.
266. Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* 1998;141:779-789.
267. Yoo NJ, Kim S, Lee SH. Mutational analysis of WTX gene in Wnt/beta-catenin pathway in gastric, colorectal, and hepatocellular carcinomas. *Dig Dis Sci* 2009;54:1011-1014.
268. Zabolinejad N, Sharifi N, Tabatabaee A, Mirsadraee S, Merikhi A. A Immunohistochemical expression of P53 protein in histologically favorable Wilms tumor and its relationship to tumor stage at presentation. *IJBMS* 2006;9:70-74.
269. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 2005; 438:873-877.
270. Zirn B, Samans B, Wittmann S, Pietsch T, Leuschner I, Graf N, Gessler M. Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45: 565-574.
271. Zirn B, Wittmann S, Graf N, Gessler M. Chibby, a novel antagonist of the Wnt pathway, is not involved in Wilms tumor development. *Cancer Lett* 2005;220:115-120.